

APPLICATIONS OF FLUORESCENT N-NUCLEOSIDES AND FLUORESCENT STRUCTURAL ANALOGS OF N-NUCLEOSIDES

Publication number: JP9505556 (T)

Publication date: 1997-06-03

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:


- international: C07H19/04; C07H19/06; C07H19/16; C07H21/00; C12N15/09; C12Q1/68; C07H19/00; C07H21/00; C12N15/09; C12Q1/68; (IPC1-7): C07H19/06; C07H19/16; C12N15/09; C12Q1/68


- European: C07H19/04; C07H21/00G; C12Q1/68B2; C12Q1/68B2D


Application number: JP19940507174T 19940818

Priority number(s): WO1994US09316 19940818; US19930108457 19930818

Also published as:

 WO9505391 (A1)

 EP0669928 (A1)

 CA2145750 (A1)

Abstract not available for JP 9505556 (T).

Abstract of corresponding document: **WO 9505391 (A1)**

Structural analogs of the six non-fluorescent N-nucleosides commonly found in RNA and DNA, which are inherently fluorescent under physiological conditions, are identified and methods for their preparation provided. Such analogs may be incorporated into DNA and/or RNA oligonucleotides via either enzymatic or chemical synthesis to produce fluorescent oligonucleotides having prescribed sequences. Such analogous sequences may be identical to, or the analogous complement of, template or target DNA or RNA sequences to which the fluorescent oligonucleotides can be hybridized. Methods of preparing either RNA or DNA oligonucleotide probes of the invention, intermediates used in such methods, and methods of using the probes of the invention in oligonucleotide amplification, detection, identification, and/or hybridization assays are also provided.

Data supplied from the **espacenet** database — Worldwide

Family list

14 application(s) for: **JP9505556 (T)**

Sorting criteria: Priority Date Inventor Applicant Ecla

- 1 **Applications of fluorescent N-nucleosides and fluorescent structural analogs of N-nucleosides**
 Inventor: CONRAD MICHAEL J [US] Applicant: CHROMAGEN INC [US]
 EC: C07H19/04; C07H19/04D; (+2) IPC: C07H19/04; C07H21/00; C07H21/04; (+12)
 Publication AT244259 (T) - 2003-07-15 Priority Date: 1992-02-12
 info:
- 2 **APPLICATIONS OF FLUORESCENT N-NUCLEOSIDES AND FLUORESCENT STRUCTURAL ANALOGS OF N-NUCLEOSIDES**
 Inventor: CONRAD MICHAEL J [US] Applicant: CHROMAGEN INC [US]
 EC: C07H19/04; C07H19/04D; (+2) IPC: C07H19/04; C07H21/00; C07H21/04; (+9)
 Publication CA2129105 (A1) - 1993-08-19 Priority Date: 1992-02-12
 info:
- 3 **APPLICATIONS OF FLUORESCENT N-NUCLEOSIDES AND FLUORESCENT STRUCTURAL ANALOGS OF N-NUCLEOSIDES**
 Inventor: CONRAD MICHAEL J [US] Applicant: CHROMAGEN INC [US]
 EC: C07H19/04; C07H21/00G; (+2) IPC: C07H19/04; C07H19/06; C07H19/16; (+12)
 Publication CA2145750 (A1) - 1995-02-23 Priority Date: 1993-08-18
 info:
- 4 **Applications of fluorescent N-nucleosides and fluorescent structural analogs of N-nucleosides**
 Inventor: CONRAD J [US] Applicant: CHROMAGEN INC [US]
 EC: C07H19/04; C07H19/04D; (+2) IPC: C07H19/04; C07H21/00; C07H21/04; (+12)
 Publication DE69333073 (T2) - 2004-04-15 Priority Date: 1992-02-12
 info:
- 5 **APPLICATIONS OF FLUORESCENT N-NUCLEOSIDES AND FLUORESCENT STRUCTURAL ANALOGS OF N-NUCLEOSIDES.**
 Inventor: CONRAD MICHAEL J [US] Applicant: CHROMAGEN INC [US]
 EC: C07H19/04; C07H19/04D; (+2) IPC: C07H19/04; C07H21/00; C07H21/04; (+12)
 Publication EP0628051 (A1) - 1994-12-14 Priority Date: 1992-02-12
 info: EP0628051 (B1) - 2003-07-02
- 6 **APPLICATIONS OF FLUORESCENT N-NUCLEOSIDES AND FLUORESCENT STRUCTURAL ANALOGS OF N-NUCLEOSIDES.**
 Inventor: CONRAD MICHAEL J [US] Applicant: CHROMAGEN INC [US]
 EC: C07H19/04; C07H21/00G; (+2) IPC: C07H19/04; C07H19/06; C07H19/16; (+10)
 Publication EP0669928 (A1) - 1995-09-06 Priority Date: 1993-08-18
 info:
- 7 **Applications of fluorescent N-nucleosides and fluorescent structural analogs of N-nucleosides**
 Inventor: Applicant:
 EC: C07H19/04; C07H19/04D; (+2) IPC: C07H19/04; C07H21/00; C07H21/04; (+9)
 Publication JP7504087 (T) - 1995-05-11 Priority Date: 1992-02-12
 info:
- 8 **APPLICATIONS OF FLUORESCENT N-NUCLEOSIDES AND FLUORESCENT STRUCTURAL ANALOGS OF N-NUCLEOSIDES**
 Inventor: Applicant:
 EC: C07H19/04; C07H21/00G; (+2) IPC: C07H19/04; C07H19/06; C07H19/16; (+11)
 Publication JP9505556 (T) - 1997-06-03 Priority Date: 1993-08-18
 info:
- 9 **Probes comprising fluorescent nucleosides and uses thereof**
 Inventor: CONRAD MICHAEL J [US] Applicant: CONRAD, MICHAEL J
 EC: C07H19/04; C07H21/00G IPC: C07H19/04; C07H21/00; C07H19/00; (+3)
 Publication US5652099 (A) - 1997-07-29 Priority Date: 1992-02-12
 info:

10 Fluorescent universal nucleic acid end label

Inventor: CONRAD MICHAEL J [US]	Applicant: CHROMAGEN INC [US]
EC: C07H19/04; C07H19/04D; (+1)	IPC: C07H19/04; C07H21/00; C12Q1/68; (+5)
Publication info: US5728525 (A) - 1998-03-17	Priority Date: 1992-02-12

11 Applications of fluorescent N-nucleosides and fluorescent structural analogs of N-nucleosides

Inventor: CONRAD MICHAEL J [US]	Applicant: CHROMAGEN [US]
EC: C07H19/04; C07H19/04D; (+2)	IPC: C07H19/04; C07H21/00; C07H21/04; (+7)
Publication info: US5763167 (A) - 1998-06-09	Priority Date: 1992-02-12

12 Fluorescent N-nucleosides and fluorescent structural analogs of N-nucleosides

Inventor: CONRAD MICHAEL J [US]	Applicant: CHROMAGEN INC [US]
EC: C07H19/04; C07H19/04D; (+1)	IPC: C07H19/04; C07H21/00; C12Q1/68; (+8)
Publication info: US6268132 (B1) - 2001-07-31	Priority Date: 1992-02-12

13 APPLICATIONS OF FLUORESCENT N-NUCLEOSIDES AND FLUORESCENT STRUCTURAL ANALOGS OF N-NUCLEOSIDES

Inventor: CONRAD MICHAEL J [US]	Applicant: CHROMAGEN INC [US]
EC: C07H19/04; C07H19/04D; (+2)	IPC: C07H19/04; C07H21/00; C07H21/04; (+12)
Publication info: WO9316094 (A2) - 1993-08-19 WO9316094 (A3) - 1993-09-30	Priority Date: 1992-02-12

14 APPLICATIONS OF FLUORESCENT N-NUCLEOSIDES AND FLUORESCENT STRUCTURAL ANALOGS OF N-NUCLEOSIDES

Inventor: CONRAD MICHAEL J	Applicant: CHROMAGEN INC [US]
EC: C07H19/04; C07H21/00G; (+2)	IPC: C07H19/04; C07H19/06; C07H19/16; (+10)
Publication info: WO9505391 (A1) - 1995-02-23	Priority Date: 1993-08-18

Data supplied from the *espacenet* database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平9-505556

(43) 公表日 平成9年(1997)6月3日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I
C 0 7 H 19/06		8615-4C	C 0 7 H 19/06
19/16		8615-4C	19/16
C 1 2 Q 1/68	Z N A	9453-4B	C 1 2 Q 1/68 Z N A A
// C 1 2 N 15/09		9162-4B	C 1 2 N 15/00 A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求(全109頁)

(21) 出願番号	特願平7-507174	(71) 出願人	クロマジェン インク
(86) (22) 出願日	平成6年(1994)8月18日		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
(85) 翻訳文提出日	平成7年(1995)4月18日		ディエゴ ロゼレ ストリート 92121
(86) 国際出願番号	P C T / U S 9 4 / 0 9 3 1 6		スイートA
(87) 国際公開番号	W O 9 5 / 0 5 3 9 1	(72) 発明者	コンラド マイケル ジュー
(87) 国際公開日	平成7年(1995)2月23日		アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サン
(31) 優先権主張番号	0 8 / 1 0 8 , 4 5 7		ディエゴ ベナノバ ストリート 11336
(32) 優先日	1993年8月18日	(74) 代理人	弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国	米国 (U S)		
(81) 指定国	EP (A T , B E , C H , D E , D K , E S , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , C A , J P		

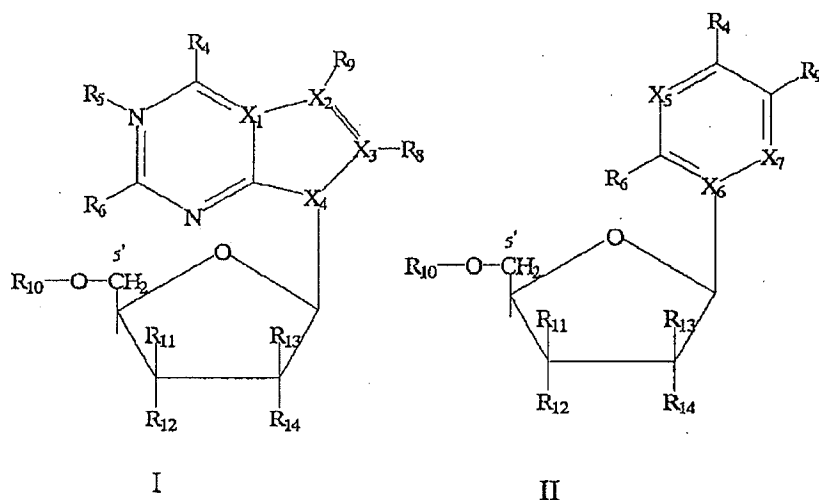
(54) 【発明の名称】 蛍光性N-ヌクレオシド及び蛍光性N-ヌクレオシド構造類似体の応用

(57) 【要約】

生理的条件下で本来的に蛍光性を有する、RNAおよびDNAに通常存在する6つの非蛍光N-ヌクレオシドの構造類似体が同定され、それらの製造方法が提供された。該類似体は、酵素的または化学的合成によって、DNAまたは/およびRNAオリゴヌクレオチド中に取り込まれ、規定された配列を有する蛍光オリゴヌクレオチドが製造される。そのような類似配列は、該蛍光オリゴヌクレオチドがハイブリダイズできる鋳型または標的DNAもしくはRNA配列と、同一であるかまたは類似した相補体である。本発明のRNAまたはDNAオリゴヌクレオチドプローブを供給する方法、該方法に用いられる中間体、オリゴヌクレオチドの増幅、検出、同定、および/またはハイブリダイゼーションアッセイに本発明のプローブを用いる方法もまた提供される。

【特許請求の範囲】

1. 以下の構造を有する蛍光性ヌクレオシド、またはその構造類似体。



ここで、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、および X_6 は、N、O、C、S、またはSiであり、 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、および X_6 のうち少なくとも一つは、Nであり、 R_4 は、検出可能な標識で誘導体化されうる反応性基であり、 R_5 はHまたは R_4 とのエテノ結合の一部であり、 R_6 は、H、 NH_2 、SHまたは $=O$ であり、 R_7 と R_8 は、水素、メチル、臭素、フッ素またはヨウ素；アルキルまたは芳香族置換体；アミド、チオエステルまたはジスルフィド結合を含む結合性分子、または x が1以上25以下の整数で、 R_1 と R_2 は、H、OH、アルキル、アクリル、アシル、アミド、チオエーテルまたはジスルフィドである $R_1-(CH_2)_x-R_2$ のようなそれらの組み合わせであり、 R_{10} は、水素、酸感受性／塩基安定性のブロッキング基またはリン誘導体であり、 R_{11} と R_{13} は水素であり、 R_{12} は、水素、OH、3'アミノ、3'アジゾ、3'チオール、3'不飽和または3'リン誘導体であり、 R_{14} は、水素、OHまたは OR_3 (R_3 は反応性基、保護基、または付加的な蛍光団)である。

2. 請求の範囲1に記載の化合物の、合成、増幅、酵素的分解、塩基対形成、標識、塩基配列決定、複製、転写、ロケーション、検出またはDNAもしくはRNAオリゴヌクレオチドの同定における、6つの通常存在する非蛍光性N-ヌクレオ

性N-ヌクレオチドのいずれかの代替物としての使用。

3. 請求の範囲2に記載の使用において、DNAもしくはRNAオリゴヌクレオチドの増幅、合成、標識、検出または同定が、(i) 化学的な、合成、伸長または結合方法か、(ii) 増幅、複製、エンドヌクレアーゼによるDNAまたはRNAの分解、転写、末端標識、フィリングまたはニックトランスレーションの酵素的方法、で行われる使用。

4. 蛍光ヌクレオシドを含む、標的ポリヌクレオチド配列の検出または増幅のために用いられるポリヌクレオチドプローブ。

5. ハイブリダイゼーションが起こる条件下で、効果的な量の請求の範囲2に記載のプローブを含む混合物と標的配列が存在する疑いのあるサンプルとを接触させ、蛍光の観測または蛍光の変化によるハイブリダイゼーションの検出を行うことを含む、標的ポリヌクレオチド配列の検出方法。

6. ゲノム内の複数の部位を同時に検出することを含む、請求の範囲5に記載の方法。

7. オリゴヌクレオチドの合成に使用するための蛍光ヌクレオシド類似体の2'-デオキシ体を製造する方法において、

(1) 該類似体を、3'、5' ジシラ(disila)保護された類似体に変換すること

(2) 2'-デオキシ-5' トリフォスフェートまたは2'-デオキシ-3'-O-フォスフォルアミダイトを製造するために、該ヌクレオシドを脱保護すること

を含む方法。

8. 核酸配列用の5' ユニバーサル末端標識剤であって、ハイブリダイズしない蛍光ヌクレオシド類似体を含む5' ホモポリマー、および核酸配列のプロモーター部位に相補的な配列を含む標識剤。

9. 請求の範囲8に記載のユニバーサル末端標識剤であって、該ホモポリマー配列および該プロモーター部位に相補的な配列の間で両配列に接続されるように位置する核酸を更に含む、ユニバーサル末端標識剤。

10. 請求の範囲8に記載のユニバーサル末端標識剤であって、単一の標的配列

に相補的な核酸配列を更に含む、ユニバーサル末端標識剤。

1 1. 以下の工程を含む、蛍光5'末端標識プローブの製造方法。

(a) 既知のプロモーター部位と該既知のプロモーター部位の下流に既知の制限部位を有する配列を、特異的な制限酵素で切断する。

(c) 挿入された標的配列のプロモーターに相補的な配列を含む蛍光ヌクレオシド類似体プローブをハイブリダイズさせる。

(d) 挿入された標的配列に相補的な特異的なプローブを合成するために、核酸ポリメラーゼを用いて、ハイブリダイズされたプロモーター領域からプローブ配列を伸長させる。

1 2. 以下の工程を含む、標的ヌクレオチド配列を検出する感度を上昇させる方法。

(a) 5'ユニバーサル末端標識を化学的に合成する。

(b) 該標的配列の識別可能な領域に相補的な、複数の核酸配列を酵素的に合成する(それぞれの該複数の核酸配列は、段階(a)の末端標識を含む)。

(c) 該複数の5'末端標識された核酸配列の混合物カクテルを作る。

(d) 該ラベルされた核酸配列を、標的核酸配列にハイブリダイズする。

1 3. 以下の工程を含む、ポリヌクレオチド中の塩基の配列を決定する方法。

(a) それぞれが異なる長さを有する複数の核酸断片(該それぞれの核酸断片は5'ユニバーサル末端標識を付加されている)を合成する。

(b) ゲル上でそれぞれ異なる長さを有する該核酸断片を分離する。

(c) 該断片長のそれぞれをゲル上で直接測定する。

1 4. 以下の工程を含む、継続するシグナル増幅を得るための方法。

(a) 相補的な二本鎖核酸配列を形成するように、二本鎖の第1の鎖を伸長する。

(b) 二本鎖を分離し、それぞれの核酸配列に相補的なプライマー配列をハイブリダイズさせる。

(c) 核酸ポリメラーゼによって、第1の鎖の核酸配列を伸長する。

(d) 繰り返し核酸鎖が合成されるように、逆転写酵素および核酸ポリメラーゼを供給する。

【発明の詳細な説明】

蛍光性N-ヌクレオシド及び蛍光性N-ヌクレオシド構造類似体の応用発明の背景A. 発明の属する技術分野

本発明はDNAやRNA中に普遍的に存在する非蛍光ヌクレオシドの蛍光構造アナログ、それらの誘導の方法及びそれに続く蛍光オリゴヌクレオチドの合成における使用、そしてそれらの蛍光モノマーとしての及び特定の配列の蛍光オリゴヌクレオチドの中においての、新しく有用な応用に関するものである。加えて、本発明は蛍光構造アナログが特定のDNAもしくはRNA配列中で特定の非蛍光ヌクレオシドと置換される応用法、及び蛍光オリゴヌクレオチドを診断や治療の目的または診断や治療の研究の道具として、ハイブリダイゼーションの試薬やプローブとして使用する方法に関するものである。

B. 技術の全般的な記述

あらゆる所から得られるDNAやRNAの組成において主成分である、6つの普遍的に存在するN-ヌクレオシドは図1に示される構造を持っているが、図の中で R_6 はイノシンにおいてHでありグアノシンにおいては NH_2 、 R_9 はウリジンにおいてHでありチミジンにおいては CH_3 である。さらに R_{12} 、 R_{14} はリボヌクレオチドにおいてOHである。2'-デオキシヌクレオチド(2'-deoxy nucleotides)においては R_{12} はOH、 R_{14} はHであり、3'-デオキシヌクレオチド(3'-deoxy nucleotides)においては R_{12} はH、 R_{14} はOH、であり、ジデオキシヌクレオチド(dideoxy nucleotides)において R_{12} 、 R_{14} は共にHである。

6つの普遍的ヌクレオチドは290nmより大きい波長の光は吸収せず、生理的条件下においては実際上非蛍光である。様々な合成、診断及び治療目的の、普遍的N-ヌクレオシドの誘導体は良く知られているが、その中にはヘテロサイクリック(heterocyclic)な塩基やフラノース環の置換体が含まれる。これらの置

換は図2に示された位置において可能であるが、その中で R_4 は検出可能なラベル(NH_2 、 SH 、 $=O$ であり、それらはアミド、チオエーテル、あるいはジス

ルフィド結合を含む(がそれに限らない)、あるいは任意の結合相手、もしくは追加の様々な反応基、 R_1 から R_3 (例えば $R_1-(CH_2)_x-R_2$ または $R_1-R_2-(CH_2)_x-R_3$ など(x は1から25の間の整数であり、 R_1 、 R_2 及び R_3 はH、OH、アルキル基、アシル基、アミド基、チオエーテル基またはジスルフィド基であり得る)の組み合わせ); R_5 はHまたは R_4 とのエテノ結合の一部; R_6 はH、 NH_2 、SHまたは $=O$; R_9 は水素、メチル基、臭素(bromine)、フッ素(fluorine)またはヨウ素(iodine)もしくはアルキルまたは芳香族置換体、もしくはアミド基、チオエーテル基またはジスルフィド結合を含む任意の結合相手、もしくは $R_1-(CH_2)_x-R_2$ または $R_1-R_2-(CH_2)_x-R_3$ -(x は1から25の範囲の整数)のような組み合わせ; R_{10} は水素または酸感受性の塩基の安定なブロッキング官能基、もしくはリン誘導体、 $R_{11}=R_{12}=H$; R_{12} は水素、OHまたはリン誘導体; R はH、OHまたはOR(R は保護基もしくは追加的な蛍光担体)である。N-ヌクレオシドやC-ヌクレオシドにおけるNやCの文字はグリコシジル共有結合が糖やヘテロサイクリック塩基において結合している原子を示している。普遍的ヌクレオシドの場合、塩基はアデニン、グアニン、シトシン、イノシン、ウラシルまたはチミンのいずれかである。塩基はフラノース糖に結合しているが、その一般的な構造は図3に示している。蛍光アナログの糖置換体はすべてのR基について同じ番号付けの体系を共有するが、いくつかのヘテロサイクリックアナログについての番号付けの体系は異なる場合もある。

I. ヌクレオチドの既知のラベル法

ヌクレオチド配列は、ターゲットDNAやRNAとハイブリダイズする診断や治療用のプローブや、ターゲット配列の増幅を含む様々な応用に一般的に用いられている。ヌクレオチド配列のラベルが必要になる、又は便利であることがよくある。

A. 放射性同位元素を用いたオリゴヌクレオチドプローブのラベル法

特異的なDNAまたはRNA配列のハイブリダイゼーションは典型的には最小

5塩基から10、000塩基(10kb)以上の範囲の長さを持つオリゴヌクレ

オチドのアニールンを含む。近年の研究目的に用いられるオリゴヌクレオチドプローブの大半は放射活性によりラベルされている；しかし（a）一般的な使用における同位体の短い半減期（b）安全性の必要及び（c）放射活性を持つプローブの取り扱いや廃棄の費用、が理由で簡便で感度の良い非同位性（non-isotopic）の検出方法がハイブリダイゼーション診断法の広範囲にわたる普及と応用を達成するために求められる。

B. オリゴヌクレオチドプローブのラベリングの非同位元素による方法

一般的に現在利用できる非同位性のハイブリダイゼーションプローブの検出法のすべてが、検出のために抗体の結合、酵素的な作用、または結合した“レポーター”分子の蛍光または化学発光などの、ヌクレオチドのある種の誘導によっている。多くの場合、オリゴヌクレオチドは一般に環内または環外の特定の位置で同じレポーター基の単一のもしくは複数の分子を取り込むことにより誘導される。レポーター基をとりつける技術は、

（a）モノメリックなヌクレオシドまたはオリゴヌクレオチドの5'または3'末端の脱保護化されたオリゴヌクレオチドを用いた水もしくは非常に親水性の溶媒中での種々の化学反応による機能化（Cardullo et al. [1988] PNAS 85:8790-8794）（b）（i）保護された反応性の官能基、例えばNH₂、SH、CHOやCOOHなど（ii）NHSエステル、アルデヒドまたはヒドラジド（hydrazides）のような活性化しうる単機能のリンカー、もしくは（iii）ヘテロサイクリック塩基またはフラノース部位に結合したビオチンのようなアフィニティーバインディンググループの合成（完全なオリゴヌクレオチドまたはターミナルトランスフェラーゼまたは“ニックトランスレーション”（Brumbaugh et al. [1988] PNAS 85:5610-5614; Sproat, B.S., A.I. Lamond, B. Beijer, P. Neuner, P. Ryder [1989] Nucl. Acids Res. 17:3371-3386; Allen, D.J., P.L. Darke, S. J. Benkovic [1989] Biochemistry 28:4601-4607）を通して化学合成の間にオリゴヌクレオチド内に引き続いて取り込まれるモノメリックヌクレオシドに修飾がなされる。）

（c）例えば5'-アミノヘキシル-3'-O-フォスフォルアミダイト（Hara

Iambidis, J., L. Duncan, G.W. Tregar [1990] Nucl. Acids Res. 18:493-499)

のように化学的合成の間に保護されたオリゴヌクレオチドの5'末端に結合される適当な保護をされた化学物質の使用

(d) 糖部分またはポリマーのフォスフォジエステル骨格中への官能基の付加 (Conway, N.E., J. Fidanza, L.W. McLaughlin [1989] Nucl. Acids Res. Symposium Series 21:43-44; Agrawal, S., P.C. Zamecnik [1990] Nucl. Acids Res. 18:5419-5423)

に大きく依存している。

最も単純な方法では、非ヌクレオチドリinkerとラベルが酵素的または化学的方法により、存在するオリゴヌクレオチドの3'または5'末端に付加される。DNAまたはRNA鎖配列中のヌクレオシド残基の修飾は、反応条件がRNAやDNAオリゴマーが無傷で、しかし、通常のワトソン-クリック型塩基対形成やスタッキング相互作用できる反応産物を得ることが可能なほど穏やかでなければならないことから、難しい操作であることが明らかにされている(図4参照)。

C. 複素環式塩基の誘導体化(B)

環内や環外両方の誘導のためのいくつかの方法が述べられてきたが、それらには以下のものが含まれる。

(1)ハプテンラベリング

DNAプローブがアミノ修飾され、続いてラベルとして発光性の基質を用いて作用させることができる、酵素結合を施された抗ハプテン抗体が結合する2、4-ジニトロフェノール(DNP)のようなハプテンを持つように誘導される(Keller et al. [1988] Analytical Biochemistry 170:441-450)。

(2)アミノおよびチオール誘導オリゴヌクレオチド

TakedaとIkeda ([1984] Nucl. Acids Research Symposium Series 15:101-104)はプトレセイニルチミジン(putresceinyI thymidine)のフォスフォトリエステル誘導体をアミノ誘導されたオリゴマーの調製に用いた。RuthらはC5の長さで一級アミンの"リンカーアーム"の12炭素を用いてデオキシウリジンアナログを合成する方法について述べている(Jablonski et al. [1986] Nucl. Acids Res. 14:6115-6128)。これらはその後蛍光分子を生成するために蛍光体と反応

させ

られた。UrdeaとHornは1990年にC₄の6-アミノ基が修飾されたピリミジン誘導体に関する特許を取得した(U.S. Patent No. 4,910,300)。3'と5'がアミノ修飾されたフォスフォルアミダイト(Phosphoramidites)は化学的合成もしくは誘導されたオリゴヌクレオチドにおいて広く用いられており商品として入手できる。

(3) フォトビオチンまたは他のビオチン化試薬を用いたラベリング

ビオチンのアビジンに対する高い親和性は、酵素的に結合させることや化学発光性の試薬を誘導されたDNAプローブに結合させるのに利用されてきた(Foster et al. [1985] Nucl. Acids Res. 13:745-761)。他のリンカーに結合されたビオチンもまた広く利用されてきたが、それらはビオチン-NHSエステル(Bayer, E.A., M. Wilchek [1980] Methods in Biochemical Analysis 26:1)、ビオチンスクシンアミド(Lee, W.T., D.H. Conrad [1984] J. Exp. Med. 159:1790)、そしてビオチンマレイミド(Bayer, E.A. et al. [1985] Anal. Biochem. 149:529)を含む。Reisfeldら([1987] BBRC 142:519-526)はビオチンハイドロアジド(biotin hydrazide)をシチジンの4-アミノ基をラベルするのに用いた。アデニンの6位、シトシンの4位、そしてグアニンの2位におけるそのような誘導に対して、Klevanらに1989年に特許が与えられた(U.S. Patent No. 4,828,979)。これらの誘導は水素結合そして塩基対形成を阻害するため、ハイブリダイゼーションに使うオリゴマーを生成する場合においては用途が限られてきた。

(4) dU-ビオチンラベリング

ヌクレオシド5'-トリフォスフェイトまたは3'-O-フォスフォルアミダイト(3'-O-phosphoramidites)はウラシルの5位においてアリファチックアミノ基(aliphatic amino group)と結合したビオチンにより修飾された(Langer et al. [1981] PNAS 78:6633-6637; Saiki et al. [1985] Science 230:1350-1354)。ヌクレオチドトリフォスフェイト誘導体は"ニッケトランスレーション"の標準的な技術により二重鎖DNAに効率的に取り込まれる。一度オリゴヌクレ

オチドに取り込まれればその残基は、蛍光、化学発光または酵素的作用による検出に利用できるアビジン、ストレプトアビジンもしくは抗ビオチン抗体に結合される。

(5)11-ジゴキゲニン-ddUTPラベリング

酵素ターミナルトランスフェラーゼはオリゴヌクレオチドの3'末端に一つのジゴキゲニン-11-ジデオキシUTP (digoxigenin-11-dideoxyUTP) を結合するのに使われている。続いての標的核酸へのハイブリダイゼーションにより、DIG-ddUTPラベルされたハイブリダイゼーションプローブは、対をなす抗DIG抗体を使用して検出された。

(6)AAIF

蛍光抗体による検出は、プローブが例えばビオチン-11-UTPにより誘導されたRNA:DNAハイブリッドに対して特異的なモノクローナルFab'断片を使用して行うことができる (Bobo et al. [1990] J. Clin. Microbiol. 28:1968-1973; Viscidi et al. [1986] J. Clin. Microbiol. 23:311-317)。

(7)シトシンのビスルファイト修飾

DraperとGold ([1980] Biochemistry 19:1774-1781) はビスルファイト (bisulfite) により触媒された終結反応によりシチジンに脂肪族アミノ基 (aliphatic amino groups) を導入した; アミノ基は続いて蛍光タグによりラベルされた。この手順ではアミノ基はピリミジン塩基に直接結合している。ウラシルの誘導のようにこれらの誘導は水素結合や塩基対形成を阻害するため、ハイブリダイゼーションオリゴマーを効率よく生成するのに有用とは限らない。

(8)フルオロフォアが誘導するDNAプローブ

テキサスレッド (スルフォクロロローダミン (Sulfochloro-Rhodamine)) 誘導されたプローブは、特定の標的DNAにハイブリダイズするものやフローサイトメーターまたは顕微鏡を使用して検出できるものが商業的に入手可能である。何人もの著者が5'または3'末端にアミノ基またはチオール基を持つ化学的に合成されたオリゴヌクレオチドに蛍光単体を結合させることについて報告している (Brumbaugh et al. [1988] Nucleic Acids Res. 16:4937-4956)。

(9) 直接的酵素ラベリング

化学的に合成されたプローブに酵素を直接化学的に結合させることは、基質の変換を通して直接検出するのに使われてきた。例えば、Urdeaらは複数のDNAプローブハイブリダイゼーションを固定相に標的DNAを結合するのに用い、その後それをさらに追加的なアルカリホスファターゼにより誘導されたハイブリダイ

ゼーションプローブによりラベルするオリゴヌクレオチドサンドイッチアッセイについて述べている (Urdea et al. [1989] Clin. Chem. 35:1571-1575)。

(10) アクリジニウムエステルラベリング (Acridinium ester labeling)

1分子のメチルアクリジニウム (methyl acridinium) のフェニルエステルがRNAまたはDNAプローブの中央部に付加される。エステルの加水分解によりアクリドン (acridone)、 CO_2 および光が放出される。ハイブリダイズしていないプローブのエステルは標的となるRNAまたはDNAにハイブリダイズしているプローブ上のエステルよりも早く加水分解されるため、ハイブリダイズしたプローブの化学発光はフリーのプローブのそれから区別可能であり”ハイブリダイゼーションプロテクションアッセイ”において使用される (Weeks et al. [1983] Clin. Chem. 29:1474-1479)。

D. フラノース環の誘導体化 (F)

フラノース環 (図3の R_{11} から R_{14}) とオリゴヌクレオチドのフォスフォジエステル骨格 (図3の R_{10}) における誘導の方法が報告されている。

(1) ヌクレオチド内に結合したレポーター基 (R_{10} 部位)

フォスフォロチオエートエステル (phosphoro-thioate esters) がモノブロモビマン (monobromobimane) のような蛍光担体の結合部位を提供するのに使用されてきた (Conway et al. [1989] Nucl. Acids Res. Symposium Series 21:43-44)。AgrawalとZamecnik ([1990] Nucl. Acids Res. 18:5419-5423) はアミン特異的レポーター基 (例えばモノブロモビマン) やチオール特異的レポーター基 (例えばフルオレセインイソチオシアネート (fluorescein isothiocyanate)) をDNAのフォスフォジエステル骨格をそれぞれフォスフォルアミダイトやフォ

スフロロチオエートジエステル (phosphorothioate diesters) へと修飾することにより取り込む方法を報告している。

(2) 配糖体性のレポーター基 (R_{11} から R_{14} 部位)

Smith、Fung及びKaiser ([1989] U. S. Patent No. 4,849,513) はアリファチックアミノ基を R_{10} に導入することによる誘導体の取りそろえと、ヌクレオシドやヌクレオシドアナログのグリコシド部分へのラベルのための合成について述べている。著者らは化学的にまたは酵素的につくられた元来蛍光性のオリゴヌクレ

オチドのいかなる使用や応用についても、あるいは蛍光ヌクレオシドアナログまたはその誘導体の使用についても報告も主張もしていない。

E. オリゴヌクレオチドをラベルする非同位元素法の限界

非放射性的の検出可能なオリゴヌクレオチドの種類を作り出すためには、DNAやRNAプローブに使用されるヌクレオシドを化学的に修飾することが必要であるがこのことがそのようなプローブ調製を高価でわずらわしいものにしてきた；多くの場合検出するための化学反応も実際使用するには煩わしく高価であることが明らかになっており、それらのことが臨床研究室における重要な応用法を発見することの失敗の大きな原因である。それらのハイブリダイゼーションへの応用では化学的に誘導されたプローブの他の制約も明らかになってきた。

(1) 化学的に誘導されたdNTPは、増幅されたDNAのラベリングがPCR増幅におけるデオキシヌクレオチドトリフォスフェイトのストックとして使用することは一般的に費用に見合わないのので(i) 予めラベルされたプライマーを用いた増幅または(ii) ラベルされたハイブリダイゼーションプローブとのアニーリングに限られて使用される。前者を使用することは(i) 増幅の間におけるプライマーのDNA上の非標的領域への非特異的アニーリング、もしくは(ii) 以前の増幅実験から残っている研究室環境中に存在する増幅物の混入、による増幅中の偽陽性を頻繁に生ずる。費用とハイブリダイゼーション後のプロセッシングにおける技術的困難は、ラベルされたハイブリダイゼーションプローブの研究と応用を制限してきた。

(2) 塩基対合は、配列中の不適当な部位へのかさばったまたは非水素結合塩基

の導入を通して、誘導された塩基からつくられた多くのオリゴマーにおいて邪魔される。多くの臨床サンプルの元から存在する化学発光のバックグラウンドによって、アクリジニウムエステルプローブでさえその理論的な検出感度のレベルを達成することができない。ハイブリダイゼーション後のプロセッシングの必要性はそのような方法に制約を残している。

(3) 大量に安価に生成できる非放射性ラベルされたプローブを提供することは困難であることが明らかになっている。

(4) 化学発光性のプローブは寿命が短く、今までテストされたプローブは定量することや正確に”リプローブ”することが困難である。

(5) 殆どの場合のハイブリダイゼーションは推測されるだけであり、非定量的もしくは半定量的で自動化できないものである。

これらの制約は、臨床研究試験や治療目的の使用へのDNAやRNAハイブリダイゼーションプローブの応用を妨げてきた。

F. 蛍光性N-ヌクレオシドと蛍光性構造類似体

原型的な蛍光ヌクレオチドアナログであるフォルマイシンA (Formycin A) (一般的にフォルマイシンと呼ばれる) は、元々 *Nocardia interforma* の培養液から抗腫瘍抗生物質として単離され (Hori et al. [1966] J. Antibiotics, Ser. A 17:96-99)、その構造が 7-アミノ-3-b-D-リバフラノシル (1H-ピラゾロ-[4,3d]ピリミジン) [7-amino-3-b-D-ribofuranosyl(1H-pyrazolo-[4,3d]pyrimidine)] と同定された (図5と6)。この抗生物質 [*Streptomyces lavendulae* (Aizawa et al. [1965] Agr. Biol. Chem. 29:375-376) および *Streptomyces gummaensis* (日本国特許番号10,928/1967年に「Nippon Kaya Co., Ltd.」に特許された) の培養液からも単離された] は、あらゆる由来のRNA中に普通に見られる、数ある微生物性のN-ヌクレオシドのC-ヌクレオチドアナログのうちの一つである。微生物から単離された自然に存在する他のC-ヌクレオチド (図4) はフォルマイシンB (Koyama et al. [1966] Tetrahedron Lett. 597-602; Aizawa et al., supra; Umezawa et al. [1965] Antibiotics Ser. A 18:178-181)、オキシフォルマイシンB (oxoformycin B) (Ishizu

ka et al. [1968] J. Antibiotics 21:1-4; Sawa et al. [1968] Antibiotics 21:334-339)、シュードウリジン (pseudouridine) (Uematsu and Suahdolnik [1972] Biochemistry 11:4669-4674)、ショードマイシン (Showdomycin) (Darnall et al. [1967] PNAS 57:548-553)、ピラゾマイシン (pyrazomycin) (Sweeney et al. [1973] Cancer Res. 33:2619-2623)、そしてミニマイシン (minimycin) (Kusakabe et al. [1972] J. Antibiotics 25:44-47)を含む。フォルマイシン、フォルマイシンB、そしてオキソフォルマイシンBはピラゾロピリミジンヌクレオシド (pyrazolopyrimidine nucleosides) であり、それぞれアデノシン、イノシン及

びヒポキサンチンの構造アナログである；自然界から得られたグアノシンのピラゾピリミジン (pyrazopyrimidine) 構造アナログは文献中に報告されていない。これらの化合物の生合成に関する詳細なレビューはOchi et al. (1974) J. Antibiotics xxiv:909-916に記載されている。

ヌクレオチド類似体の物理的性質

C-ヌクレオシドのうちのいくつかは抗微生物、抗ウイルスまたは抗腫瘍化合物として知られているため、それらの化学誘導及び物理的性質は詳しく調べられ、DNAやRNA中に普通に見いだされるN-ヌクレオシドの構造や合成と比較されてきた。1960年代の後半に、6つの普通に存在するN-ヌクレオシドのいくつかの構造アナログが生理的条件下で蛍光性であることが発見された；例えば得られたタイプの、例えばC-ヌクレオシドのすべての構造アナログがすべて蛍光性な訳ではなく、蛍光性が構造アナログのすべての特定の種類の独占的あるいは元来の性質という訳でもない。本発明者は、ピラゾロ (pyrazolo) 及びピロロ (pyrolo) ピリミジンやプリンのうち一部だけが蛍光性であり、その性質は図5から図11にその構造が示されているいくつかの置換されたN-ヌクレオシド、アザヌクレオシド (azanucleosides)、エテノヌクレオシド (ethenonucleosides) を含む (がそれに限らない) いくつかのヌクレオシド誘導体や構造アナログにも共有されていることを示した。四角い枠によって囲まれている図5から図11に示される構造は、以前に報告されたものか、本発明を生み出す過程で蛍光

性であることが見いだされたものである。

蛍光アナログを含む、性質が明らかにされていないオリゴマーがWardらにより物理的研究のために、当時利用できたヌクレオシドポリメラーゼ酵素を使用して調製された(Ward et al. [1969] J. Biol. Chem. 244:3243-3250; Ward et al. [1969] loc cit 1228-1237)。蛍光ヌクレオシドもしくはその構造アナログを合成あるいは分子生物学のハイブリダイゼーション技術と絡めたり、そこから蛍光オリゴヌクレオチドを合成するのに使用する試みについては文献中には最近の報告はない。

本発明の簡単な要約

本発明は蛍光性のヌクレオシドアナログに関するものである。これらの蛍光ヌクレオシドアナログはヌクレオチド配列の合成やラベリングにおけるモノマーとして有益である。本発明はさらにオリゴヌクレオチドプローブの合成において自然界に存在するヌクレオシドを代替することができるこれらの蛍光ヌクレオチドの使用にも関係する。ハイブリダイゼーションのプローブとして使用した場合、そのようなオリゴヌクレオチドの蛍光は、特定の遺伝子配列を検出し同定する診断のためのツールとして用いることが可能である。この手法は酵素や反応性の蛋白質と結合させたヌクレオチドを利用せず、ハイブリダイゼーションの検出にハイブリダイゼーション後の処理を必要としないという点において他の非放射性プローブ検出法とは区別される。

「背景」の章で述べたように、DNAやRNAプローブ技術において近年使用されている方法や組成には多くの欠点がある。本発明の目的は(i) 鋳型または標的DNAに相補的な配列中の決められた位置に現れる、元の非蛍光ヌクレオチドの特定の置換体として、また(ii) 鋳型の、産物の、増幅された、あるいは標的のDNAまたはRNAの特定の配列の同定と検出のためのラベルとして、規定された配列中に直接取り込ませられる蛍光ヌクレオシド及びその蛍光構造アナログの利用を通して、以前の技術のこれらの欠点を克服することである。

本発明の他の目的として、新たな、元来蛍光性のヌクレオシド及びヌクレオシドアナログ、及び新たなトリフォスフェイト及びフォスフォルアミダイト型を提

供することであるが、それらはラベルされたポリヌクレオチドプローブ、増幅物、診断物、及び治療物の合成に役立つ。本発明の更なる目的は、標的DNAあるいはRNAの規定された配列と特異的なワトソン-クリック型塩基対を形成できる自己蛍光オリゴヌクレオチドを作る方法を提供することである。

本発明の他の目的は、本発明の方法に従って合成された蛍光ヌクレオチドアナログ及びそこから作られたオリゴヌクレオチドを既知のDNAおよびRNA核酸配列の同定、存在の検出や機能の変更に使用する方法を提供することである。加えて、検出方法の発展及び簡素化、DNAおよびRNAハイブリダイゼーション技術の、応用と使用を簡素化することが目的である。

本発明の別の面として、DNA二重鎖の両方ではなく、センス鎖だけまたはアンチセンス鎖だけに相補的で、片方のみに結合する核酸プローブを作製する（非対称的な合成）ための酵素的方法が提供される。非対称的な合成がすばやく定量的な核酸プローブ試験法、アッセイ法、診断法そして治療法を開発するのに必要な条件であるということは、本発明の重要な一面である。非対称的な合成の重要な一面は、二重鎖のうちの片方の鎖のみを鋳型として用い、プロモーター、プライマー、またはリンカーにより修飾されたプライマーを、オリゴヌクレオチドまたはオリゴマーの合成または単離を方向付けする際に非対称的に使用することに依存するということである。

また本発明の別の側面として、一個の核酸、ジェノミックDNA、または染色体上の独立で唯一の標的部位に同時にハイブリダイズできる非対称的なプローブの”カクテル”を同時に合成ために用いられる複数の異なる鋳型において、非対称的な合成が、方向付けされた使用を可能にするということがある。プローブ”カクテル”の発明の重要な一面は、実施例7に示されている多コピーのタンデムリピートインタージェニック配列（tandem repeat intergenic sequences）のように、もし一つのゲノム上に同じ標的配列が複数コピー存在すると、非対称なプローブの一つの鋳型が、配列は同じだがゲノム上の位置が広い範囲に散らばっているようなゲノム上の多くの標的に結合する”カクテル”を作り出すのに利用できるということである。

本発明の一つの面として、オリゴヌクレオチドの合成、ラベリング、そして検出に有用な、図5～図11の構造式を持つ、普通に存在するヌクレオシドの蛍光構造アナログとその誘導体を提供するということがある。普通に存在するヌクレオシドはその特徴として、図4に示すようなワトソン-クリック塩基対合と呼ばれる水素結合を、特異的なドナー/アクセプターの関係で形成する。適当な場所では、普通のヌクレオシドのワトソン-クリック水素結合形成に類似した形を再現することができる特定の蛍光ヌクレオシドアナログを、例えば図4におけるA:Tとフォルマイシン:Tのようにドナー/アクセプターの形で提供する。

本発明の別の面として、自然界に存在するヌクレオシドの蛍光構造アナログの、 R_{10} 、 R_{12} および R_{14} 部位を(i)DNAまたはRNAの合成において活性化すること、及び(ii)構造アナログからの蛍光の共鳴エネルギー転移における活性化状態へ誘導するステップを含む、作製と誘導の方法が提供される。

さらに本発明の別の面として、ポリヌクレオチドプローブの合成と使用の方法が蛍光構造アナログもしくはその誘導された形のうちの一つまたは複数を使用して提供される、ということがある。そのようなプローブは、多数の単鎖または二重鎖ポリヌクレオチドを含むサンプルのスクリーニングに使用できるし、目的の配列が存在するならば、ハイブリダイゼーションによりラベルし、検出し、同定することができる。蛍光オリゴヌクレオチドプローブを、図12～図18に描かれたような”ソリューションハイブリダイゼーション”法に使用できることは本発明の重要な一面である。

先に述べた目的に従えば本発明は、そこから作製されたオリゴヌクレオチドをラベル、修飾、あるいは同定するのに使用できる元来蛍光性のヌクレオシド、それらの元来蛍光性のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションプローブとしての使用、及びヌクレオチド配列の検出方法を含む。

本発明の重要な一面は蛍光担体の安定な蛍光放射、そしてサンプル中に存在する蛍光担体の量を検出し定量するための「time-resolved分光器」または光子計数の利用である。

さらなる方式、長所、使用法、及び本発明の新たな特徴は以下の「説明」中に

述べられるが、一部は以下の方法を試験して当業者に明らかになるか、本発明を実現することで修得されるであろう。

図面の簡単な説明

図1はDNAやRNA中で主要な、6種類の普通に存在するN-ヌクレオシドを示している。

図2は普通に存在するN-ヌクレオシドの一般的な構造及びその誘導部位R_nを示している。

図3はプリン及びピリミジンヌクレオシド両方のフラノース環の一般的な構造及び誘導によく使われる部位R_nを示している。

図4は通常のN-ヌクレオチドであるA:T及びG:C間でのワトソン-クリック塩基対、及びフォルマイシン:T、フォルマイシン:U、2、6-ジアミノプリン:T、及び5-アミノ-フォルマイシンB:Cの間での塩基対を示している。

図5は生物由来の、普遍的N-ヌクレオシドの構造アナログを示している。

図6はピラゾロ(pyrazolo)[4,3d]ピリミジンヌクレオシドアナログを示している。

図7はピラゾロ[3,4d]ピリミジンヌクレオシドアナログを示している。

図8はピラゾロ[1,5a]-1,3,5-トリアジン(triazine)ヌクレオシドアナログを示している。

図9はアザピリミジン及びアザプリンヌクレオシドアナログを示している。

図10はデアザピリミジン及びデアザプリンヌクレオシドアナログを示している。

図11A-11Bはいくつかの蛍光構造アナログの例を示している。

(11A) 非H結合アナログ

(11B) 蛍光共鳴エネルギー転移(fluorescence resonance energy transfer (FRET))アナログ

図12はFTPまたはATPを用いた対称的RNA合成の図解である。

図13はウイルスのプロモーターとウイルスRNAポリメラーゼを用いた、プ

ロモーターに方向付けされた非対称的なRNAプローブ合成の図解である。

図14はpUC/M13プラスミドベクターのEcoRI部位に挿入された単鎖DNAの一段階ラベリングの方法の例とdF₁₀₅'の利用の図解を示している。

図15は標的DNAへの早くしかも定量的なハイブリダイゼーションのための非対称的なDNAまたはRNAプローブの使用の必要性を示した図解である。示してあるように、非対称的なプローブは対称的なプローブと比較して顕著にハイブリダイゼーション効率の上昇をもたらす。

図16はリボヌクレオチドアナログであるフォルマイシンAの2'-デオキシトリフォスフェイト型、またはフォスフォルアミダイト型への変換を示した図である。

図17は蛍光プローブを用いたジェノミックDNAハイブリダイゼーションにおける標的DNA配列検出の図である。

図18は蛍光プローブのソリューションハイブリダイゼーションによる増幅DNA断片の検出の図である。

図19はRNAプローブ中におけるATPのFTPによる酵素的置換反応に続いて未反応試薬から反応産物を分離するのに使われた分離方法を図にしたフローチャートを示している。

図20は異なる配列の複数のプローブを含むプローブ"カクテル"の使用による検出感度増大機構の概要(schematics)を示している。

図21A-21F-1はすでに同定され種類、構造、化合物名、吸収分光、放射分光、及び合成法などの特性を明らかにされた特定の蛍光ヌクレオシドアナログを示している。

図22は4つの区別される官能基からなる5'ユニバーサルエンドラベルを示しているがそれには以下のものが含まれる：領域A、1からおよそ50蛍光ヌクレオシドアナログの長さにあたる塩基対を形成しないホモポリマー；領域B、領域Aと領域Cをつなぐ任意の非ヌクレオシド性のフォスフォジエステルの"つなぎ"；領域C、標的配列中のプロモーターと相補的な、酵素的な合成のプライマ

一；そして領域D、標的ヌクレオチド配列と相補的なおよそ40から20、000塩基の長さを持つヌクレオチド鎖。典型的なもので20から60塩基の長さを持つ領域A、B、Cは化学的に合成可能である。領域Dは酵素的な合成が好んで用いられる。5'ユニバーサルエンドラベルの合成については実施例8に述べられている。

図23は高度に蛍光性の5'ラベルされたプローブの合成法の概略を示している。合成法は以下のステップからなる：(1)既知のプロモーター部位と既知のプロモーター部位の下流の既知の制限酵素部位を持つ配列を特定の制限酵素により切断、(2)制限酵素部位への唯一の標的配列を挿入、(3)挿入された標的配列のプロモーターに相補的な配列からなる蛍光ヌクレオシドアナログプローブのハイブリダイゼーション、そして(4)挿入された標的配列に相補的な特定なプローブを合成するために、核酸ポリメラーゼを用いてのハイブリダイズしたプロモーター領域からのプローブの伸長。

図24はF₁₈₅(ethenoadenosine)とF₁₀₅(formycin)の標準化されたスペクトルプロファイルを示している。化合物のスペクトルは250-450nmの間

で2.5nmスリットを使用して決定された。

図25は検出、あるいは5'ユニバーサルエンドラベルの複数のコピーを用いたディファレンシャルラベリングの感度を増大させる方法について示している。示されているのは標的配列の例であり、プローブの使用はそれぞれのプローブ配列が標的配列上の異なる断片や領域に相補的であるようなそれぞれ複数のプローブ配列の5'ユニバーサルエンドラベルである。

図26は塩基配列決定への5'ユニバーサルエンドラベルの応用を示している。ユニークなプローブ(図24中に示している方法により作製することができる)異なる長さを持つ複数のジデオキシ断片を生成するのにDNAポリメラーゼを用いることで利用できる。

図27は持続的シグナル増幅(Sustained Signal Amplification)の手順を示している。図中の例では二重鎖ゲノムを形成しているDNAが二つの異なる長さ

を持っているヘパティティスBビリオン (Hepatitis B virion) 由来のゲノムを用いている。この方法は以下のステップを示す：(1)ヌクレオチドまたはリン酸化されたヌクレオシドアナログを使用した短い方のDNA鎖の伸長；(2)二つの鎖の分離と、二つのプライマー、AとBの付加；(3)逆転写酵素を用いたAプライマーがハイブリダイズしたDNA鎖の伸長；(4)合成された二重鎖配列の(a)RNAポリメラーゼを用いた合成DNAからのアンチセンスRNAの生成、(b)プライマーBと核酸ポリメラーゼを用いたRNA鋳型からのDNA合成、及び(c)Bプライマー-DNAからの二重鎖DNAの合成(DNA複製)、を含む増幅サイクル中における合成二重鎖配列の利用。複製DNAはその後、シグナル増幅サイクル(ステップ(4))を繰り返すことができる。

配列の簡単な説明

配列番号1は本発明に従った合成オリゴヌクレオチドである。

配列番号2は合成オリゴヌクレオチドであり、配列番号1に相補的である。

配列番号3は合成オリゴヌクレオチドであり、配列番号2の蛍光アナログである。

発明の詳細な開示

ここに開示され請求されているのは、新たな蛍光ヌクレオシドアナログ、及び蛍光ヌクレオシドの、例えば核酸プローブや診断キットへの使用方法である。一つの望ましい具体化例としては、固相合成(solid phase synthesis)、鋳型に方向付けされたポリメラーゼチェーン反応法を用いたポリメライゼーション及び増幅を含む、DNAハイブリダイゼーションプローブの化学的または酵素的合成における元来蛍光性のヌクレオシドアナログの使用に関するものがある。他の具体化例は特定のDNA配列の同定、例えば遺伝子マッピング、感染症や遺伝子疾患の検出や診断など、における自己蛍光DNAハイブリダイゼーションプローブの使用に関するものがある。

特に本発明は、蛍光性であるヌクレオシドアナログや、オリゴヌクレオチドの合成において普通のヌクレオシドと置き換わることが可能なヌクレオシドアナログに関係する。ハイブリダイゼーションプローブとして使用する場合、そのよう

なオリゴヌクレオチドの蛍光は、特定の遺伝的配列の検出と同定のための様々な手法に使用することが可能である。この方法論は、酵素や他の反応性の蛋白質と結合させたヌクレオチドを使用しないという点で、他の非放射性プローブ検出法とは区別される。それ故ここに記載された方法は、日常的で自動化された臨床診断のためのハイブリダイゼーション技術の開発における、元来蛍光性のヌクレオシドアナログの応用である。

本発明の蛍光アナログは以下の3つの一般的な種類に分けられる：(A) C-ヌクレオシドアナログ；(B) N-ヌクレオシドアナログ；そして(C) N-アザヌクレオチド及びN-デアザヌクレオチドのアナログ、である。これらの化合物すべては共通して以下の3つの特徴を持っている：1) これらはオリゴヌクレオチドの酵素的あるいは化学的な合成において自然界に見られるヌクレオシドと置換することが可能な、普遍的ヌクレオシドのアナログである；2) これらは適当な波長の光により励起された際に元々蛍光性であり、その検出に更なる化学的または酵素的な処理を必要としない；3) これらは自然界に存在するDNA中に見られるヌクレオシドとは異なるスペクトルを持つ。本発明の少なくとも125の特定の化合物が同定されている。種類、構造、化学名、吸収スペクトル、放射

スペクトル、及び合成法に従って特性を明らかにされたこれらの化合物は図21A～図21F-1に示されている。

定義 以下の定義は記述の理解を助けるために提供される：

”普遍的に存在するヌクレオシド”は図1に示してある6つのモノメリックなN-ヌクレオチドであるが、これらは自然界に存在するDNAやRNA中で主要なもので、古典的なワトソン-クリック塩基対に取り込まれ、生理的条件下では実際的には非蛍光性である。配列の略記中のそれぞれの1文字記号は、A, C, G, T, U, I がそれぞれアデノシン、シチジン、グアニジン、チミジン、ウリジン、そしてイノシンを表している。

普遍的に存在するヌクレオシドの”構造アナログ”(Structural Analogs)とは、構造(原子やその配列の種類)が普遍的に存在する塩基に似ているが、基本的な生物活性または生化学的な機能に影響を与えないようなある種の修飾や置換

を受けている場合もあるような、通常のプリンまたはピリミジン塩基に似せた、構造的に関連した分子のことである。そのような塩基アナログは、イミダゾールとその2、4-及び/又は5-置換誘導体；インドールとその2-、3-、4-、5-、6-及び/又は7-置換誘導体；ベンズイミダゾール (benzimidazole) とその3-、4-及び/又は5-置換誘導体；インダゾール (indazole) とその3-、4-、5-、6-及び/又は7-置換誘導体；ピラゾールとその3-、4-及び/又は5-置換誘導体；トリアゾール (triazole) とその4-及び/又は5-置換誘導体；テトラゾール (tetrazole) とその5-置換誘導体；ベンゾトリアゾール (benzotriazole) とその4-、5-、6-及び/又は7-置換誘導体；8-アザアデニンとその置換誘導体；6-アザチミンとその置換誘導体；6-アザウラシルとその置換誘導体；5-アザシトシンとその置換誘導体；8-アザヒポキサンチンとその置換誘導体；ピラゾロピリミジン (pyrazolopyrimidine) とその置換誘導体；3-デアザウラシル；オロチン酸 (orotic acid)；2、6-ジオキソ-1,2,3,6-テトラヒドロ-4-ピリミジンカルボン酸 (2,6-dioxo-1,2,3,6-tetrahydro-4-pyrimidine carboxylic acid)；バルビツール酸；尿酸；エテノアデノシン (ethenoadenosine)；エテノシチジン (ethenocytidine)；アロプ

リノール類 (4-ヒドロキシ-ピラゾロ [3, 4 d] ピリミジン)；あるいはこれらの保護された誘導体を含む (がこれに限らない)。塩基アナログはまた、図4及び図5に示すような、通常の塩基とフラノース間の間のC-N結合がC-C結合で置換されたようないかなるC-ヌクレオシドでもあり得る；そのような塩基には、C-ヌクレオシドシュードウリジン中のウラシル；1-メチルウラシル；1,3-ジメチルウラシル (1,3-dimethyluracil)；5(4)-カルボメトキシ-1,2,3-トリアゾール (5(4)-carbomethoxy-1,2,3-triazole)；5(4)-カルボキサミド-1,2,3-トリアゾール (5(4)-carboxamido-1,3-triazole)；3(5)-カルボキシメチルピラゾール (3(5)-carboxymethylpyrazole)；3(5)-カルボメトキシピラゾール (3(5)-carbomethoxypyrazole)；5-カルボエトキシ-1-メチルピラゾール (5-carboethoxy-1-methylpyrazole)；

(C-ヌクレオシドショードマイシン (C-nucleoside showdomycin) 中の) マレイミド (maleimide) ; (C-ヌクレオシドピラゾマイシン (C-nucleoside pyrazomycin) 中の) 3(4)-カルボキサミド-4(3)-ヒドロキシピラゾール (3(4)-carboxamido-4(3)-hydroxypyrazole) ; 及び図5から11中にリストされるか推測されている他のすべてのアナログ ; もしくはその保護された誘導体を含む (がそれに限らない)。

” 蛍光担体 ” (Fluorophore) とは、検出可能な範囲に蛍光を放射する能力のある物体またはその一部を指す。ヌクレオチドの蛍光構造アナログにおいては、典型的にはこの蛍光は紫外線近い ($> 300 \text{ nm}$) 波長から可視波長のあたりに生じる。望ましいのは蛍光が 300 nm から 700 nm の間の波長に生ずることであり、最も望ましいのは 300 nm から 500 nm の間の可視波長で生ずることである。

” 蛍光構造アナログ ” (Fluorescent Structural Analogs) は図5から図11に示されたような、6つの普遍的なヌクレオシドの、合成的もしくは生化学的に誘導されたモノメリックな構造アナログをさす。それらが標準的なワトソン-クリック塩基対を形成できるかできないかはモノマー構造及び/またはそれらが使用されたオリゴヌクレオチドによるが、それらはスペクトル的にユニークであり生理的条件下での選択的な励起と放射の能力において普遍的なヌクレオシドと区別

される。たとえばC-ヌクレオシドであるフォルマイシンAはアデノシンと同様のドナー/アクセプター水素結合を形成することができるアデノシンアナログであるが、最大励起波長は 303 nm であり最大放射波長は 405 nm である (ストークスシフト = 102 nm)。

” 誘導 ” (Derivatized) ヌクレオシドアナログは、反応性または保護官能基が、共有的にもしくは別の方法で、複素環 (heterocycle) の R_4 から R_9 位、もしくはグリコシド基の R_{10} ($5'$)、 R_{12} ($3'$) 及び R_{14} ($2'$) 位に結合している蛍光構造アナログである。 $2'$ グリコシジル位での誘導体は蛍光共鳴エネルギー転移 (fluorescent resonance energy transfer (FRET)) のアクセプター

または蛍光構造アナログ自身の固有の蛍光放射を強めるもしくは吸収しより長い波長で再放射するドナー、を含む。

“ポリヌクレオチド”、“オリゴヌクレオチド”、または“オリゴマー”とは、2つ以上の普遍的ヌクレオチドまたは蛍光構造アナログを含む鎖状のヌクレオチドである。ここで用いられる“蛍光オリゴヌクレオチドプローブ”または“蛍光ハイブリダイゼーションプローブ”とは上記のように、少なくとも1つが蛍光性であるような2つ以上のモノマーを含む鎖状のヌクレオチドである。

“ハイブリダイゼーション”とは、2つの相補的な単鎖分子のワトソン-クリック塩基対を通した一組ごとのアニーリングである(図4)が、それはDNA:DNA, DNA:RNA, RNA:RNAのいずれでもよい。アニーリングは、(i)水素結合のドナーとアクセプターが図4のような向きに並んでいる相補的な塩基対、及び(ii)プローブがハイブリダイズする特定の遺伝子、標的DNA、または標的RNA(以後“標的DNA/RNA”)に相補的な遺伝的配列、に特異的である。例として、アデノシンとフォルマイシンの水素結合のパターン(図4)の比較が挙げられる。

“DNA/RNA融解温度”及び“ T_m ”は、DNAあるいはRNAのハイブリダイズした鎖の間の水素結合が壊され2つの鎖が一本鎖へと解離する、つまり二重鎖もしくはハイブリッドが壊される温度を指す。

“アナログな蛍光配列”は、本発明中に述べられているいずれかの酵素的または化学的方法によって合成されたポリヌクレオチドのヌクレオシド配列であり、

かつその中で普遍的ヌクレオシドが蛍光ヌクレオシドアナログと明白に置き換わっている(例えば決められたDNA鋳型に相補的なRNAプローブの作製にRNAポリメラーゼを使用する場合、アデノシン-5'-トリフォスフェイト(ATP)の代わりにフォルマイシンA-5'-トリフォスフェイト(FTP)での置換)ものを指す。アナログな蛍光配列においては、蛍光ヌクレオシドアナログはオリゴヌクレオチド鎖中で一部もしくはすべての普遍的ヌクレオチドの、酵素的合成の際には鋳型によって決まる位置で置き換わっている。同様のプログラム

された置換は、標準的なフォスフォジエステル結合形成の間それぞれの蛍光アナログの3'-O-フォスフォルアミダイト(3'-O-phosphoramidites)を使用することで行うことが可能である。従って例えば、*Chlamydia tracheomatis*のMOMP遺伝子の相補的な配列、もしくはその蛍光アナログ配列が、それぞれdATPまたはdFTPを用いてDNAポリメラーゼ、dCTP, dTTP, dGTPの存在下で酵素的に合成することが可能である：

MOMP遺伝子配列(配列番号1)：

AAC GTT CGA GAC GGA CAC CCC TTA GGA CGA CTT GGT TCG

相補的配列(配列番号2)：

TTG CAA GCT CTG CCT GTG GGG AAT CCT GCT GAA CCA AGC

類似した蛍光配列(配列番号3)：

TTG CFE GCT CTG CCT GTG GGG FFT CCT GCT GFF CCF FGC

この中で類似した配列中の下線部の蛍光デオキシフォルマイシンA(F)は、相補的配列中の対応する位置のデオキシアデノシン(A)の構造アナログである。

”FRETアクセプター”または”蛍光共鳴エネルギー転移アクセプター”とは、物質、置換体、クロモフォア(chromophore)、または蛍光担体(例えばダンシル(dansyl)、ナフチル(naphthyl)、アントリル(anthryl)、ピレニル(pyrenyl)、メチルアンベリフェロン(methylunbelliferone)、あるいはクマリン基(coumarin))を指すが、それらは蛍光構造アナログドナーからの放射光を吸収し、そのエネルギーを他のより長い波長で再放射する能力がある。本発明においては、そのような2次的な蛍光担体は第2のラベルにより選択的に励起されるか、蛍光アナログエネルギードナーの1次蛍光を拡げて増強するための蛍光ア

クセプターとして使われる。

A. 蛍光ヌクレオシドアナログの構造、起源、合成、及び誘導体化

簡潔に述べると、本発明は生理的条件下において蛍光性である普遍的ヌクレオシド塩基(B)のヘテロサイクリックピリミジンもしくはプリン構造アナログ

、及びそれが炭素-炭素もしくは炭素-窒素結合によりリボース ($R_{12}=R_{14}=\text{OH}$)、デオキシリボース ($R_{12}=\text{H}$, $R_{14}=\text{OH}$ または $R_{12}=\text{OH}$, $R_{14}=\text{H}$)、ジデオキシリボース ($R_{12}=R_{14}=\text{H}$)のフラノース環(図4-9中Fで表される)に結合したもの、及び以下に述べるようなそれらの誘導体、および/またはヌクレオチド化学に明るい者に自明なものに関連する。

本発明においては、フォルマイシン、2-アミノプリンリボヌクレオシド、及び2、6-ジアミノリボヌクレオシド(これらすべては(i)アデノシンと同じまたはそれに似た塩基対水素結合を形成でき、(ii)核酸の複製、ライゲーション、リン酸化を含む幅広い酵素反応においてワトソン-クリック塩基対中のアデノシンを特異的に置換できる)が蛍光ヌクレオシド及びヌクレオシドアナログ(図4)の代表として用いられる。本発明において、関連した性質や同等のクレームは、すべての他のグアノシン、シチジン、チミジン、ウリジン、イノシンの蛍光アナログ及びその誘導体についても適用できる。

(1)ヌクレオシドアナログの構造

普遍的なヌクレオシドに対する構造アナログの各タイプに属するプリンやピリミジン構造体が、図5~図11のそれぞれの上段に示してあり、下段には各種類のアナログの代表例が示してある。図6と図7ではプリンアナログの例だけが示してあるのは、その既知のピリミジンアナログが図5に既に描かれているからである。 R_4 , R_6 , R_9 での置換のみが知られているN-ヌクレオシドアナログの例外を除いて、各ページの上段に属する構造では、複素環塩基への置換が図1に示された普遍的N-ヌクレオシドからアナログを区別するような構造の部分を楕円で囲っている。

(2)蛍光ヌクレオシドアナログに一般的なフラノース分子

フラノースにおける糖炭素の番号は図2に示すように1'から5'となっている;そのため塩基、B、は糖のC1に結合している。本発明中で請求されているすべての蛍光複素環のフラノース基は、他のすべてのアナログと共通して、セットF、グリコシド及び置換されたグリコシド、を以下に述べるように持っている:基本的には、置換は5つの糖炭素のいずれにおいても行われる;サブセットF

は誘導体及び／又は R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , R_{14} 位における置換によって定義されるが、これらは(i)当業者にとって明らかであり、(ii)本発明中に述べられているすべての蛍光ヌクレオシドアナログのフラノシル誘導体である。これらはすべてのリン酸置換(例えばトリフォスフェイト(triphosphate)、チオフォスフェイト(thiophosphate)、アミノフォスフェイト(aminophosphate)など)や R_{10} 位でのすべての保護置換(protecting substitutions)(例えばジメトキシトリチル)を含む。図5から図11中のすべてのグリコシド、Fについて、 R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} , および R_{14} が以下のように定義されている: R_{11} および $R_{13}=H$; $R_{14}=H$, OH または OR_i ; R_{12} と R_{10} は共に H , OH , OR_m 、または NHR_k であるが、その中で(a) R_i 保護基は典型的には、例えばメチル、*t*-ブチル、ベンジル、*o*-ニトロベンジル、*p*-ニトロベンジル、*o*-ニトロフェニル、またはトリフェニルメチルのような、低級アリル基もしくはアルキルエーテル;又はアセチル、ベンゾイル、*p*-ニトロベンゾイルもしくはアルキル基のような低級アルキル基やアリルエステル;テトラヒドロピラニル基(tetrahydropyranyl)のようなアセタール;トリメチルシリル(trimethylsilyl)や*t*-ブチルジメチルシリルエーテル(*t*-butyl-dimethylsilyl)のようなシリル基(silyl);*p*-トルエンスルフォニル基(*p*-toluenesulfonyl)やメタンスルフォニル基(methanesulfonyl)のような硫酸エステル(sulfonic acid);臭素(bromine)、フッ素(fluorine)、ヨウ素(iodine)のようなハライド(halide)、である。適当な保護基の追加例はGreen, T.W. (1981) Protective Groups in Organic Synthesis, New York: Wiley&Sonsの中に見いだされる。他にも R_{14} はFRET誘導体でもよい。これには、例えば(これに限られるものではないが)、次の蛍光体が含まれる。7-[3-(クロロジメチルシリル)プロポキシ]-4-メチルクーマリン、*O*-4-メチルクーマリニル-N-[3-トリエトキシシ

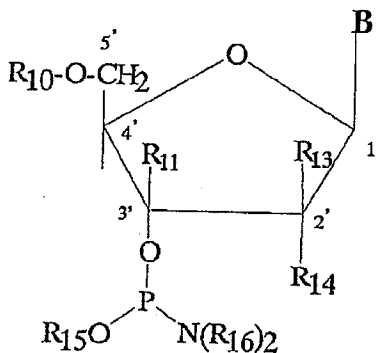
リル)プロピルカルバメート、N-3-トリエトキシシリルプロピル)ダンシルアミド;(b) R_m は2'または3'-アミド、2'または3'-アジド、2'、3'-不飽和、及びリン酸エステル、トリフォスフェイトエステル、またはア

ミノフォスフェイトエステルを持つオリゴヌクレオチドの酵素的または化学的合成に関与するリン酸誘導体のサブセットを含む適当な保護、置換、または反応性リンカー基を代表している；(c) R_k はペプチド合成 (Geiger, R., W. König [1981] In The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology, Vol. 3, E. Gross, J. Meienhofer, eds., Academic Press, New York, pp.1-99) に広く用いられているような一般的で標準的な窒素保護基 (nitrogen protecting group) である；これはホルミル基 (formyl)、*t*-ブチロキシカルボニル基 (*t*-butyloxycarbonyl)、ベンジロキシカルボニル基 (benzyloxycarbonyl)、2-クロロベンジロキシカルボニル基 (2-chlorobenzoyloxycarbonyl)、4-クロロベンジロキシカルボニル基 (4-chlorobenzoyloxycarbonyl)、2,4-ジクロロベンジロキシカルボニル基 (2,4-dichlorobenzoyloxycarbonyl)、フルフリロキシカルボニル基 (furfuryloxycarbonyl)、*t*-アミロキシカルボニル基 (*t*-amyloxycarbonyl)、アダマンチロキシカルボニル基 (adamantylloxycarbonyl)、2-フェニルプロピル-(2)-オキシカルボニル基 (2-phenylpropyl-(2)-oxycarbonyl)、2-(4-ビフェニル)プロピル-(2)-オキシカルボニル基 (2-(4-biphenyl)propyl-(2)-oxycarbonyl)、トリフェニルメチル基 (triphenylmethyl)、*p*-アニシルジフェニルメチル基 (*p*-anisyl diphenylmethyl)、ジ-*p*-アニシルジフェニルメチル基 (di-*p*-anisyl diphenylmethyl)、2-ニトロフェニルスルフェニル基 (2-nitrophenylsulfenyl)、またはジフェニルフォスフィニル基 (diphenylphosphinyl) のような酸に不安定な保護基を含む (がそれに限らない)；トリフルオロアセチル基 (trifluoroacetyl)、9-フルオレニルメチロキシカルボニル基 (9-fluorenylmethyloxycarbonyl)、4-トルエンスルフォニレチロキシカルボニル基 (4-toluenesulfonylethyloxycarbonyl)、メチルスルフォニレチロキシカルボニル基 (methylsulfonylethyloxycarbonyl)、及び2-シアノ-*t*-ブチロキシカルボニル基 (2-cyano-*t*-butyloxycarbonyl) のような、塩基に不安定な保護基；他にもクロロアセチル

基 (chloroacetyl)、アセトアセチル基 (acetoacetyl)、2-ニトロベンゾイル基 (2-nitro-benzoyl)、ジチアサクシノイル基 (dithiasuccinoyl)、マレ

オイル基 (maleoyl)、イソニコチニル基 (isonicotinyl)、2-ブロモエチロキシカルボニル基 (2-bromoethyloxycarbonyl)、及び2, 2, 2-トリクロロエチロキシカルボニル基 (2,2,2-trichloroethyloxycarbonyl) のように; あるいは R_k は検出可能なラベル (NH_2 、 SH) = O であり、それらはアミド、チオエーテル、ジスルフィド結合あるいはそれらの付加的な可変の反応基 R_1 から R_3 の組み合わせ (例えば $R_1 - (\text{CH}_2)_x - R_2$, x は1から8の間の整数; R_1 , R_2 , R_3 はH, OH, アルキル、アシル、アミド、チオエーテルまたはジスルフィド基) を含む任意の結合部も含む) で誘導可能なすべての反応基、またはヒドラジド (hydrazides)、マレイミダゾール (maleimidazoles)、酸化可能なジオール (oxidizable diols)、そしてスクシニミジル基 (succinimydyl groups) のような反応基を含む (がすべてではない) ような、ホモバイファンクショナルあるいはヘテロバイファンクショナルなリンカーとして働くすべてのリンカーまたはスペーサーでありうる。せいぜい R_{12} と R_{10} のうち一つだけ NHR_k であり得る。

本発明はさらに以下の構造式を持つ新規のフォスフォルアミダイト (phosphoramidites) を含む:



この中でBは本文中で述べた蛍光ヌクレオシドアナログのいずれかであり、 R_{10} , R_{11} , R_{12} , R_{13} はグリコシド、F、のセットとして上記に定義されており、 R_{14} はHかOHである。 R_{16} = 低級アルキル、その中でもメチル基またはイソプロピル基、もしくはモルフォリノ基 (morpholino)、ピルロリドノ基 (pyrrolidono)、または2, 2, 6, 6-テトラメチルピルロリドノ基 (2,2,6,6-tetrame

thylpyrrolidono) のような複素環; R_{15} = メチル基、ベータシアノエチル基 (beta-cyanoethyl)、p-ニトロフェニル基、o-クロロニトロフェニル基 (o-chloronitrophenyl) または p-クロロフェニル基 (P-chlorophenyl) である。すべての他の R 基は 1 から 25 炭素原子の長さを持つスペーサーまたはリンカーアームとして同定されているものを含む、以前に示されたものである。(i) ワトソン-クリック塩基対に関わる複素環上の重要な反応性置換体を保護し、(ii) アミダイトを DNA または RNA 鎖形成の化学反応できるようにするため、 R_{12} でのフォスフォルアミダイトの合成に先立って、フォスフォルアミダイト中の塩基 B は保護されうるが、それにはエキソサイクリックアミノ基 (exocyclic amino groups) のアセチル化またはアミデーション (amidation) が含まれ、アセチル、ベンゾイル、イソブトリル (isobutryl)、スクシニル (succinyl)、フタロイル (phthaloyl)、または p-アニソイル (p-anisoyl) が含まれる (がすべてではない); ジメチルフォルマミジン (dimethylacetamidine)、ジ-n-ブチルフォルマミジン (di-n-butylformamidine) またはジメチルアセタミジン (dimethylacetamidine) を含む (がそれがすべてではない) アミジン基のような; もし B がカルボキシル、ヒドロキシル、またはメルカプト基のような他の反応性官能基と置換されると、それらは同様に適当に保護される。

本発明は固相支持体上でのオリゴヌクレオチドの合成にまたがっているが、その中で図5から図11に描かれたようにオリゴマーは保護された蛍光ヌクレオシドアナログであるフォスフォルアミダイトと反応し、上記の構造のように誘導される。加えて本発明は、その配列中に最低一つ、上記の構造中のフォスフォルアミダイトのように誘導された蛍光ヌクレオシドアナログを含む新規の蛍光オリゴヌクレオチドを含む。さらに本発明のさらに別の側面として、固体支持体に結合した前述の蛍光体 3'-O-フォスフォルアミダイトの反応によって作製された蛍光オリゴヌクレオチドを提供することである。

(3) 蛍光ヌクレオシドアナログの起源および他の製造方法

フォルマイシン A (formycin A) は *Nocardia interforma* の培養液からリボヌクレオチドとして単離される。抗生物質は *Streptomyces lavendulae* と *Streptomyces*

ces gummaensisの培養液からも単離され、それらはあらゆるところから得られる

R

NA中で普遍的に見つかる、数々の微生物性のN-ヌクレオシドのC-リボヌクレオシドアナログのうちの一つである。微生物から単離された他の普遍的なC-ヌクレオシドアナログ(図5)はフォルマイシンB、オキソフォルマイシンB(oxoformycin B)、シュードウリジン(pseudouridine)、ショードーマイシン(showdownmycin)、ピラゾマイシン(pyrazomycin)、そしてミニマイシン(minimycin)を含む。フォルマイシンA、フォルマイシンB、そしてオキソフォルマイシンBは図6に示された種類のC-ヌクレオシドまたはピラゾロピリミジンヌクレオシド(pyrazolopyrimidine)であり、それぞれアデノシン、イノシン、ヒポキサンチンの構造アナログである;自然界から得たグアノシンのピラゾロピリミジン構造アナログは文献では報告されていないが、2-クロロフォルマイシンBまたはそのデオキシ型から化学的に合成可能である。これらの化合物の生合成に関する詳細なレビューはOchi et al. (1974) J. Antibiotics xxiv.:909-916にある。C-ヌクレオチドのN4およびN6の誘導体の合成はLewisとTownsend([1980]J. Am. Chem. Soc. 102:2817)の文献中に述べられている。アイソメリックなアミノピラゾロー[3,4d]-ピリミジン(isomeric aminopirazolo-[3,4d]-pyrimidines)はWierchowskiら[他のすべてのものはリボース、そしていくつかはデオキシ及びジデオキシ系で商品として入手可能である(それらにはアザヌクレオチドやデアザヌクレオチドが含まれる)か、7-デアザアデニン(7-azaadenine)(Gerster et al. [1967] J. Med. Chem. 10:326)のようにde novoに合成可能である]の文献中に述べられている。

デオキシ、ジデオキシ、リン酸化された形の蛍光リボヌクレオシドアナログの製造

化学合成は、N-ヌクレオシドの2'-デオキシ型や3'-デオキシ型、C-ヌクレオシドと同じようにエテノヌクレオシド(ethenonucleosides)は文献に従って誘導に用いることができる(Robins et al. [1973] Can. J. Chem. 51:1313; Jain et al. [1973] J. Org. Chem. 38:3719; DeClerq et al. [1987] J

. Med. Chem. 30:481)。似たような手法がアザヌクレオチド、デアザヌクレオチドについて得られており、同じ及び追加の源についても見つかっている（例えば Robins et al. [1977] Can. J. Chem. 55:1251; DeClerq et al., supra)。3'-アジ

ド、3'-アミノ、2'、3'-不飽和、及び2'、3'-ジデオキシアナログの合成のためのプロトコルや手法は報告されている通りである（Lin et al. [1987] J. Med. Chem. 30:440; Serafinowski, P. [1987] Synthesis 10:897）。2'-OHのシリル基またはFRET基による保護あるいは誘導はPattersonとAndersonによってなされている（[1989] Silicon Compounds: Register and Review, Petrarch Systems, Inc., pp.60-70）。

ここに報告されているのは、アナログの2'-デオキシ型だけ生じるC-ヌクレオチドのリボースからデオキシリボースへの変換のサイクリック保護法（cyclic protection procedure）の新たな応用であり、この方法から、先に述べた文献によるアセトキシイソブチリルハリド法（acetoxisobutyryl halide procedure）を用いた場合に生じる2つのアイソマーを分離するために必要な、難しい精製なしに高い収量を得ることが可能である。

酵素的合成のためには、ヌクレオシドアナログのモノー及びトリフォスフェイト型が、例えば確立された手法を使用しポリヌクレオチドキナーゼを用いて、あるいは化学的フォスフォリレーションによって調製することが可能である。一般的には、5'-モノフォスフェイトはPOC12を用いて化学的に調製される（Smith and Khorana [1958] J. Am. Chem. Soc. 80:1141; Yoshikawa et al. [1967] Tetrahedron Lett. 5095）。対応するトリフォスフェイトは同じ著者、またはMitchelson（[1964] Biochem. Biophys. Acta 91:1）；あるいはHoardとOtt（[1965] J. Am. Chem. Soc. 87:1785）に従った方法により化学的に合成可能である。これはモノフォスフェイトがカルボジイミド（Carbodiimide (CDI)）、続いてトリブチルアンモニウムピロフォスフェイト（tributylammonium pyrophosphates）により処理されトリフォスフォリル化された型を生ずるものである。露出したアミノ基のところでアナログをフォスフォリル化する必要があるところで

は、そのような置換体は、Thayerら ([1974]Biochem. J. 139:609) の方法に従ってエチルトリフルオロチオアセテート (ethyltrifluorothioacetate) で処理することによりチオアセチル化することができる。

B. 蛍光オリゴヌクレオチドの合成

本発明は、通常ヌクレオチドにみられる蛍光ヌクレオシドアナログのひとつ、

または複数を、合成ヌクレオチドに導入する合成方法を提供するものである。

(1) 蛍光フォスフォルアミダイトの使用 蛍光フォスフォルアミダイトは本発明によって得られるものであるが、蛍光残基は、ヌクレオシドアナログ、例えば 2'-デオキシフォルマイシン A (2'-deoxyformycin A) の保護された 3'-O-フォスフォルアミダイトの最初の合成によって、化学的合成オリゴヌクレオチドに導入される。それからフォスフォルアミダイトは、対応する標準的なフォスフォルアミダイト、この場合はデオキシ-アデノシン-3'-O-フォスフォルアミダイト (deoxy-adenosine-3'-O-phosphoramidite) に置換され、通常のフォスフォトリエステルの化学的合成法を用いて固床上で合成されたオリゴヌクレオチドと、反応させられる。 β -シアノエチル誘導体が、化学的に合成されたオリゴヌクレオチドの任意の位置に選択的に導入され、60塩基長またはそれ以上の長さの前述した塩基配列を持ち、そこにあらかじめ決めた数の蛍光塩基を取り込んだオリゴマーを作成するであろう。

例えば、ノンセルフハイブリダイジングオリゴヌクレオチドを合成したが、これらは完全に異なる塩基配列、すなわち $[AC]_x$ と $[FC]_x$ を有し、いずれも繰り返す (>98%) と合成の全収率に関してほぼ同じ値を示した上、 $[FC]_x$ が蛍光を持つのに対し $[AC]_x$ が持たないという1点においてのみ異なるというオリゴマーを生成した。ここで x とは AC と FC のダイマー対の数であり、 x は $x=10, 15, 20, 25, 30$ の値をとる。いずれのオリゴマーも、交互に $[TG]_x$ 配列を繰り返す相補的オリゴマーに対して、特異的にハイブリダイズした。しかし、(i) アガロースゲル中での臭化プロマイド染色、(ii) ハイブリッドの溶解の挙動などで示されたように、それ自身、あるいは $[AG]_x$ 、または $[TC]_x$ のような非相補的配列には、ハイブリダイズしなかった。0

、0.75 MのNaCl溶液中、 $[FC]_x : [TG]_x$ 及び $[AC]_x : [TG]_x$ ハイブリッドの溶融転移温度に相当する値は、 x （オリゴヌクレオチドの長さ）で与えられる値に対して、 1°C 以下の違いしかみられなかった。本発明が有する視点には以下のようなものが含まれることを明記しておく。すなわち、蛍光ヌクレオチドとその蛍光構造アナログの3'-O-フォスフォルアミダイトの合成、前述した塩基配列を持つ高蛍光オリゴヌクレオチドを合成する際のアミダイトの使用、

そうしたオリゴヌクレオチドを増幅プライマー、蛍光オリゴヌクレオチド”タグ”、ハイブリダイゼーションプローブとして使用すること、などである。

(2) 蛍光ポリヌクレオチドおよびポリデオキシヌクレオチドの使用 前述した配列を有する蛍光ポリリボヌクレオチドとポリデオキシリボヌクレオチドは、DNAテンプレートを用い、酵素的に合成することが可能である。このDNAテンプレートは、化学合成、クローニングテクニックによって調整、あるいはゲノムDNAから得られた試料、などを含むさまざまなものから作られる。そうした3種類のDNAテンプレート、E.coli RNAポリメラーゼ、フォルマイシンAかアデノシンのリボーストリフォスフェイトと併せて rNTPすなわちシチジン、ウリジン、グアノシンなどを用いたRNAオリゴヌクレオチドの再現性ある合成は、図12に示してある。方向性のある活性プロモーターを有するテンプレート、活性を持つRNAポリメラーゼ、フォルマイシンAかアデノシンのリボーストリフォスフェイトと併せて rNTPすなわちシチジン、ウリジン、グアノシンなどを用いたRNAプローブの再現性ある非対称合成は、図13に示してある。対称なポリデオキシリボヌクレオチドは、以下の方法を用い、2'-デオキシフォルマイシンA-5'-トリフォスフェイト(2'-deoxyformycin A-5'-triphosphate) (FTP) をデオキシアデノシン-トリフォスフェイト (deoxyadenosine-triphosphate) (ATP) に置換することによって、作られてきた。この方法とは、通常のDNAポリメラーゼ合成と、熱に安定なDNAポリメラーゼ酵素とPCR法を利用したDNA増幅である。ここで言う非対称合成は、以下に述べる変更を別にして同じ試薬と方法を用いることで、好適に行うことができた。(i)

クレノウ・フラグメントまたは修飾 T7 DNA ポリメラーゼといった DNA ポリメラーゼを用いた合成が、テンプレートとして用いられる配列のはじめの方にある二重鎖のうち的一方の鎖で始まった。また、対応するプライマーは全ての合成をはじめのために用いられた。(i i) テンプレート的一方の鎖にのみ相補的なプライマーが、非対称 PCR として通常記述されるのと同様な DNA 増幅で、用いられた。(i i i) それぞれのプライマー対のひとつがビオチンのようなリンカーと結合しているようなプライマー対が、PCR のような通常の DNA 増幅で用いられた。しかし一方の鎖は、アビジニル化カラムまたは磁気ベッドを用いるといっ

た単離を引き続き行うことによって、優先的に除去された。これに比肩し得る合成は、他の置換によって行うことも可能である。他の置換とは、例えば、リボース及びデオキシリボース形態の蛍光 N-ヌクレオシド、2-アミノプリン、2、6-アミノプリン（いずれもアデノシン-5'-トリフォスフェイトに置換された）、あるいはフォルマイシン B の蛍光 C-ヌクレオシドトリフォスフェイトまたは 5-アミノ-フォルマイシン B（それぞれイノシントリフォスフェイトとグアノシン-トリフォスフェイトに置換された）などを含む。

C. 蛍光ポリヌクレオチドの標識

RNA と DNA は、いくつかの方法で酵素的にラベルすることができる。それに含まれるものは、これだけに限定するわけではないが、(i) フォワード・リン酸化反応 (Richardson, C.C. [1965] PNAS 54:158)、またはエクステンジン・キナーゼ反応 (Van de Sande et al. [1973] Biochemistry 12:5050) のいずれかを用いた 5' DNA の末端ラベリング、(i i) 制限断片にアニールした混合配列のヘキサデオキシヌクレオチドを伸長することによる混合プライマーラベリング (Feinberg, A., B. Vogelstein [1983] Anal. Biochem. 132:6; Feinberg, A., B. Vogelstein [1984] Anal. Biochem. 137:266)、(i i i) 3' DNA 末端ラベリング、ただしこれにはターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼを、デオキシトリフォスフェイトのモノヌクレオチドユニットの繰返し付加を触媒させるために用いる (Okayama et al. [1987] Methods Enzym

ol. 154:3; Heidecker, G., J. Messing [1987] Methods Enzymol. 154:28)。
あるいは、デオキシトリフォスフェイトの一残基付加を触媒させるために用いる。
ここで言うデオキシトリフォスフェイトとは、DNA イニシエーターの3' -
水酸基末端に対するいくつかの蛍光ヌクレオシドアナログである。これには前述
した配列、例えば、以下に記述したように合成した *Chlamydia trachomatis* MOMP
遺伝子のプローブといった、非蛍光プローブを含まれている。(iv) 非蛍光”
粘着末端”あるいは”ニックド” RNA や DNA のオリゴヌクレオチドが、適当
な蛍光 RNA または DNA オリゴマーとのライゲーションによってラベルされる
ようなライゲースラベリング (Pharmacia LKB [1989] Analects 17.2; Helfman
, D.M. [1987] Methods Enzymol. 152:343)。(v) ニックトランスレーショ
ン、ただしそ

こでは DNA ポリメラーゼが、二重鎖のうち実際に読まれる DNA 鎖の中で、蛍
光アナログのトリフォスフェイトをランダムに結合させるために用いられる (Me
inkoth, J., G.M. Wahl [1987] Methods Enzymol. 152:91)。

D. 規定された配列の蛍光オリゴヌクレオチドの性質

ハイブリダイゼーション、熱融解、アガロースゲルによるキャラクタリゼーシ
ョン、蛍光検出実験を、前述した配列のオリゴヌクレオチドの性質の同定に用い
た。あるケースでは、蛍光オリゴヌクレオチドは、治療上重要な病因または突然
変異、例えば *Chlamydia trachomatis* MOMP 遺伝子配列などであるが、そこから得
られた標的 DNA の既知の配列に相補的であった。これらの研究において、蛍光
オリゴヌクレオチドの酵素的合成に用いられた鋳型は、続いて行われるハイブリ
ダイゼーション実験で標的 DNA として後に用いることをも目的としたクローン
断片で行った。標的 DNA とオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションは、
蛍光プローブ中の構造アナログの蛍光をクエンチするという結果をもたらすが、
ここでハイブリッドのデナチュレーションによって蛍光が回復するため、ハイブ
リダイゼーションが起こったと判断できるのである。合成オリゴヌクレオチドで
あるポリ (r F r U) のセルフハイブリダイゼーション (後に、長さについて記
載されている) はそうした実験で得られた結果に関して再現性があり、このこと

は表1にまとめられている。本発明によれば、望まれるべきプロセスは、4つの基本的なステップを含んでいる。まず最初に、蛍光構造アナログが化学的または生物学的に合成され、本発明に供した部分では、蛍光オリゴヌクレオチドプローブを合成するための要求にしたがって、更に誘導体が作られる。2番目として、対象となる核酸サンプルに対し相補的なDNAまたはRNAプローブ分子が、蛍光ヌクレオシドアナログを有するように構築される。ここで蛍光ヌクレオシドアナログは、(i)その全長にわたって、特異的な位置あるいはランダムな位置に分配されるか、または(ii)以下に記述されるように末端ラベルされ得る。3番目に、核酸サンプルは未反応のモノマーから分離され、直接に同定される。その際に、特異的ハイブリダイゼーションプローブに付けるための別の非特異的ラベルを用いるか、あるいはそのサンプル自体を直接ハイブリダイゼーションプローブとして用いる。後者の場合、ハイブリダイゼーションは固床で行うことにな

るであろう。この固床には、サザンブロットトランスファーか”ドット・ブロット”法のように、標的DNA/RNAかまたは蛍光プローブが固着される。あるいは、簡単な洗浄から過によって、プローブ/標的ハイブリッドをハイブリダイズしていないプローブから単離した後に、液体中でハイブリダイゼーションしてもよい(この中に含まれるのが”液体ハイブリダイゼーション”である)。最後に、標的DNA/RNAにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの蛍光が、検出および定量される。

E. 蛍光プローブ分子の構築

本発明によれば、あらかじめ選択された蛍光ヌクレオシドアナログまたは蛍光アナログの混合物は、ひとつまたはそれ以上の、通常用いられるような非蛍光ヌクレオシドに、非特異的に置換される。それらは更に、DNAまたはRNAオリゴヌクレオチドに結合して、前述した塩基配列を作る。前述した塩基配列は、通常生じるヌクレオチドから構築されたヌクレオチド配列に対するワトソン-クリック塩基対に関して同等であるように、また与えられたDNAまたはRNAに対して相補的であるように、選択されるであろう。そうした蛍光プローブは、標的DNAまたはRNAの相補配列に対するアナログであると考えられる。蛍光プロ

ープは、以下に述べるような応用に引き続き供せられるために、酵素的あるいは化学的合成のいずれかによって合成されるであろう。その応用とはすなわち、(i) ハイブリダイゼーションプローブ、(ii) 与えられたプライマーセットに対し相補的で増幅可能な遺伝子配列を直接検出するためのアンプリマー (amplimer)、(iii) 特異的ハイブリダイゼーションプローブに、例を挙げるならライゲーションによって、結合し得るような非特異的”ユニバーサル”なラベルとして用いる、といったものである。

通常存在するリボース、デオキシリボース、あるいはジデオキシリボースの蛍光ヌクレオチドアナログは、さまざまな他の簡便な酵素的及び化学的技術のいずれかを用いることによって、核酸ポリマーに結合させることが可能である。それらの技術は本明細書に記載されているが、しかしこれに限定されるものではない。

(1) 酵素による合成 酵素による合成には、以下の記載が含まれている。

(a) 小さな”ニック”をDNA二重鎖の一方の鎖に導入するためのDNAアーゼ

Iの使用。E.coliのDNAポリメラーゼIのホロ酵素型は、蛍光ヌクレオチドアナログのトリフォスフェイトの混合物とともに、それらニックの修復と拡張に用いることができる。例として、反応溶液中におけるデオキシフォルマイシン-5'-トリフォスフェイト (deoxyformycin-5'-triphosphate) (F T P) と通常存在するデオキシヌクレオチドトリフォスフェイトが挙げられる。この方法は大量の蛍光担体を、DNAポリマー (これは二重らせんの両方の鎖を含んでいる) にランダムに導入する。実施例において、通常存在するヌクレオチド (この場合はデオキシアデノシン-5'-トリフォスフェイト (dAdenosine-5'-triphosphate) (d A T P)) は、完全に除去することができ、その場所にd F T Pが置換した。その際、合成収率の著しい減少、ハイブリダイゼーション特異性の低下、DNA融解温度の値を測定することによる二重鎖形成能の増加などは、みられなかった。

(b) 先に用いた制限酵素によって生じたDNAの一本鎖領域のオーバーハングをフィルインするための、DNAポリメラーゼIのクレノウ・フラグメントとT4 DNAポリメラーゼを含む各種の酵素の使用。この方法は、それぞれのDNA

鎖の末端に蛍光アナログを濃縮する。同様に、特異的DNAテンプレートに相補的な蛍光DNAヌクレオチドは、以下の方法によって合成されることが可能である。すなわち(i)DNA断片とE. coliのDNAポリメラーゼを用いる方法、(ii)M13の、要求されるDNAテンプレート配列のすぐ5'側のフォワードプライマーのように、特異的なプライマーに対するプライマーサイトを含む組換えプラスミドを構築する方法、である。DNAポリメラーゼは、デオキシリボヌクレオチドあるいは他のデオキシアナログ(例えば、反応液中に存在するdATPの置換体としてのdFTP)を利用して、相補的なDNA鎖を合成するであろう。

(c)蛍光アナログの末端濃縮をも生じさせる結合法は、ホモポリマー、あるいはDNAオリゴマーの3'末端に蛍光デオキシアナログの"テイル"を加えるために、"テイリング"酵素(末端デオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ)を用いることを含んでいる。實際上、通常存在するヌクレオチドに蛍光アナログを置換させたとき、ホモポリマーの合成によって得られた収率は、ヘテロポリマー

の合成に際して得られた収率よりも、ずっと少なかった。それに対して、蛍光アナログのジデオキシ体、あるいは2'が保護された蛍光アナログ(FRETで保護されたアナログを含む)は別にして、一残基の蛍光ヌクレオチドアナログは、同じ酵素、全く同じ方法(ジデオキシATP(コルデシピン(cordecypin))で用いられた方法)を用いて任意のオリゴマーの3'の水酸基に付加されるであろう。エンドラベリングハイブリダイゼーションプローブの3番目の別法は、DNAリガーゼまたはRNAリガーゼの活性を利用している。それによって、非特異的二本または一本鎖蛍光オリゴヌクレオチドは、特異的なハイブリダイゼーションプローブの3'または5'末端に共有結合することが可能である。この方法において用いられた蛍光オリゴヌクレオチドは、プローブの特異性を決定するワトソン-クリック塩基対にあずかるとは限らず、しかし一般的または普遍的な蛍光"タグ"として単独で用いられるであろう。前述した方法のそれぞれについて、DNAプローブは二重鎖であり、それらの使用に先立ち、熱処理またはアルカリ処理を用いて、一本鎖形態に解離されなければならない。

(d) DNAの増幅、または複製のための標準的な方法と、市販されている数種類のDNAポリメラーゼ（熱に安定なDNAポリメラーゼ、具体的にはTaqポリメラーゼ、修飾T7DNAポリメラーゼ、クレノウ・フラグメント、T4DNAポリメラーゼを含むが、しかしそれだけに限定される訳ではない）のひとつを用いた接合法。それは、前述した長さで配列を有する蛍光プローブを生成するための標準的な方法としても用いられることが可能であるが、ヌクレオチドトリフォスフェイトの混合物中で、蛍光デオキシリボヌクレオチドアナログ（具体的には2'-デオキシフォルマイシンA-5'-トリフォスフェイト（2'-deoxyformycin A-5'-triphosphate）または5'-アミノ-デオキシフォルマイシンB-5'-トリフォスフェイト（5-amino-deoxyformycin B-5'-triphosphate））のひとつを、ATPやGTPとそれぞれ置換する。蛍光オリゴヌクレオチドは、通常存在するヌクレオチドから成り、かつ標的テンプレートDNAにハイブリダイズする非蛍光オリゴマーに対し、収率と長さに関して同等である。また、ハイブリッド二重鎖が一度形成した非蛍光コントロールが示したのと同じ程度の熱安定性とエチジウムブロミドに染色される度合いを示す。そうした増幅においては、蛍光オ

リゴヌクレオチドの生成は、ある特定の塩基配列の存在を直接に証明するものととらえることが可能であるし、その配列の同定は、(i) 確定している相補的プローブによるハイブリダイゼーションと、(ii) 類似した塩基配列を認められるようなシーケンシングなどによって、更に確定させることができる。

(e) 特異的なDNAテンプレートに対し相補的な蛍光RNAオリゴヌクレオチドの使用。ここで言う特異的なDNAテンプレートは、(i) DNA断片と、例えば図12に示したようなE.coli RNAポリメラーゼを用いることによって対称的に、あるいは、(ii) 図13に示したように、テンプレートとして用いられているような望ましいDNA配列のすぐ5'側にある、特異的DNAのRNAポリメラーゼ依存性プロモーターを含む組換えプラスミドを構築することによって非対称的に、合成することが可能である。このテンプレートの例としては、プローブと共にハイブリダイゼーションの標的として用いられるであろう塩基配列を

有する、クローニングされたChlamydia MOMP遺伝子の断片のすぐ5'側にあるT7 RNAポリメラーゼのプロモーターを持っているDNAテンプレートが挙げられる。ほとんどの応用については、非対称的合成が最も好ましい方法であるが、対応するDNA依存性RNAポリメラーゼは、リボヌクレオチド(例えば、ATPやTTPの代わりにUTPに対する置換体としてのFTPなどである。)を利用してRNA分子を合成するであろう。そのRNA分子は、テンプレートの二本鎖のうちの片方の鎖、唯一その鎖だけに対して類似の相補性を示す。こうして得られた一本鎖プローブは、変性段階なしで、次のハイブリダイゼーション反応に直接に用いることが可能である。

(2)化学合成 保護された蛍光デオキシヌクレオシドアナログの3'-O-フォスフォルアミダイト、特に、 R_{10} =ジメトキシトリチル、 R_{16} =イソプロピル、 R_{15} =メチルまたは β -シアノエチルなどは、固床支持担体に固定された、伸長しつつあるオリゴヌクレオチドの5'-OHに、標準的なフォスフォルアミダイトDNA合成技術(Atkinson, T., M. Smith [1984] Oligonucleotide Synthesis: A Practical approach, M. J. Gait, ed., IRL Press, Oxford, pp. 35-82を参照のこと)を用いることで、結合させられる。固床支持担体に結合したオリゴヌクレオチド(あらかじめ5'-OH基を脱保護するために酸洗浄してあるも

の)を、アルゴン雰囲気下、テトラゾールの存在下に無水アセトニトリル中で、5'-トリチル保護したデオキシヌクレオシドアナログの3'-O-フォスフォルアミダイトと反応させ、過剰な試薬を洗浄してから、新たな5'末端を脱保護するような溶液中で、フォスファイト生成物を望ましいフォスフェイトに酸化する。こうしたサイクルは、望ましい長さや塩基配列に達するまで、必要な回数だけ繰り返すことが可能である。付加される新たなヌクレオチドは、通常存在するヌクレオチドでもいいし、蛍光ヌクレオシドアナログでもよい。それ故、ひとつまたはそれ以上の蛍光担体が、例えばフォルマイシン残基を含む望ましい塩基配列中でのA残基全ての完全な置換に相当し、かつそれを含んでいるような、与えられたプローブに結合させられる。こうした結合は、10分間のカップリングタイムで、ミニリアクター試薬びん中、人力で行うことが可能である。または「Ph

armacia LKB遺伝子合成機」あるいはプログラム合成プロトコルを利用できる類似した機械で、行うことができる。蛍光ヌクレオチドは、多孔性ガラス床からDNAを解離させることで単離されるが、そのために、 NH_4OH ：エタノール（3：1）中で、 55°C で一晩反応させる。アンモニウムヒドロキシド溶液を含む蛍光DNAは、「Speed-Vac」中で急速乾燥され、弱塩及びpH勾配を利用して、QEAE-HPLCカラムの未反応配列から分離される。ヌクレオシドアナログのフォスフォルアミダイトの収率は、脱保護過程のトリチル陽イオンの放出から計算される、再現性ある収率を元にした標準的なアミダイトから得られる収率と、比肩し得るものである。

蛍光ヌクレオシドアナログを含むプローブ分子をどのようにして構築し利用するかということについて、特別な説明を加えるために記述したのが、以下の具体例である。この具体例は、本発明を実行するにあたって、最も優れたやり方を含む手順を示してある。これら具体例は、限界として提示されたものではない。全てのパーセンテージは、重量パーセント濃度であり、全ての溶液混合率は、特に断らない限り、体積によるものである。

例1 - フォルマイシンA (Formycin A) の2'-デオキシフォルマイシンA (2'-Deoxy Formycin A) への変換、および5'-トリフォスフェート (5'-Triphosph

ate) ならびに3'-O-(2シアノエチル)-N,N,ジイソプロピルフォルアミダイト (3'-O-(2-cyanoethyl)-N,N,-Diisopropyl Phosphoramidite) の調整

図16は、2'-デオキシ-5'-トリフォスフェイト (2'-deoxy-5'-triphosphate)、またはフォルマイシンAの2'-デオキシ-3'-O-フォスフォルアミダイト (2'-deoxy-3'-O-phosphoramidite of formycin A) を合成するための、本発明におけるスキームを図示している。De Clercqら ([1987] J. Med. Chem. 30:481) によって報告されているように、 α -アセトキシブチリル ハライド (α -acetoxisobutyryl halid) と反応させることで最初の段階がすでに達成されてはいるが、その方法は、分離が困難で収率が低い3'及び2'デオキシ体の両方を生成してしまう。本発明は、アデノシンを2'-デオキシアデノシンに変換するという行程ですでにすぐれた応用例が報告されている ([1981] J. Am. Che

m. Soc. 103:932)、3', 5'-ジシラ保護を採用している。その方法が、多くの蛍光ヌクレオシドアナログのそれに相当する変換に対して、一般的に応用可能であることが明らかにされている。

(I) 7-アミノ-3-[3', 5'-O-(1, 1, 3, 3-テトライソプロピル-1, 3-ジシロキサン-ジリル)-β-D-リボフラノシル ピラゾロ[4, 3d]ピリミジン(7-amino-3-{3', 5'-O-(1, 1, 3, 3-tetraisopropyl-1, 3-disiloxane-dilyl)-β-D-ribofuranosyl pyrazolo[4, 3d] pyrimidine)

1, 3-ジクロロ-1, 1, 3, 3-テトライソプロピル-1, 3-ジシロキサン(1,3-dichloro-1,1,3,3-tetraisopropyl-1,3-disiloxane)(0.9g、2.85mmol)を、無水ピリジン中で完全に脱水してあるフォルマイシンA(0.66g、2.5mmol)の懸濁液に加え、室温で24時間攪拌した。溶媒をT=40°Cで減圧除去し、生成物をエチルアセテートと水で抽出した。エチルアセテイト層を、(i)冷却した1N HCl、H₂O、飽和NaHCO₃水溶液、飽和NaCl水溶液の順番で洗い、続いてゴム状になるまで減圧蒸留した。シリカゲルフラッシュクロマトグラフィーを用い、(i)2.5%メタノール-クロロフォルムと、(ii)5%メタノール-クロロフォルムで段階的に溶出した後に、得られた生成物(シリカTLCでシングルスポットとなる(20%メタノール-クロロフォルム中で、R_f=0.80))は、3', 5'環状保護され

た産物であることが、プロトンNMRと元素分析によって判明した。

(II) 7-アミノ-3-[3', 5'-O-(1, 1, 3, 3-テトライソプロピル-1, 3-ジシロキサン-ジリル)-2'-(フェノキシチオカルボニル)-β-D-リボフラノシル]ピラゾロ[4, 3d]ピリミジン(7-amino-3-{3', 5'-O-(1, 1, 3, 3-tetraisopropyl-1, 3-disiloxane-dilyl)-2'-(phenoxythiocarbonyl)-β-D-ribofuranosyl pyrazolo[4, 3d] pyrimidine)

480mgのジシラ保護フォルマイシンA(0.93mmol)を、無水MeCN中でDMAP(0.9g、7.6mmol)と共に溶解した。すりガラスジョイントにマウントしたドライシリンジを用いて、200mLのフェノキシチオ

カルボニルクロライド (phenoxythiocarbonyl chloride) を滴下した後に、反応物を室温で 24 時間攪拌し、溶媒を減圧下除去した後に、生成物を再びエチルアセテートと水で分別した。エチルアセテート層は、上述と同じように洗い、溶媒を減圧除去し、残渣物をフラッシュクロマトグラフィー上で分離して、クロロフォルム-MeCN (50/50) で溶出した。求める生成物を集めたフラクションは、プロトン NMR と元素分析で同定し、以下に述べる合成の第 2 段階に供した。

(III) 7-アミノ-3-(2'-β-D-リボフラノシル)ピラゾロ[4,3d]ピリミジン(7-amino-3-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)pyrazolo[4,3d]pyrimidine)(2'-デオキシフォルマシン A(2'-deoxy formycin A))

(II) に記載されている方法から得られた生成物 240 mg を、大過剰のヘキサメチルジシラザン (hexamethyldisilazane) 中で、12.5 mg の $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ に加えた。反応混合物を、60°C 以上、オーバーナイトで還流した。減圧下溶媒を除去した後、粗トリシリル誘導体をトルエンに再溶解し、アゾビスイソブチロニトリル (azobisisobutyronitrile) と、トリブチル水素化スズ (tributyl tin hydride) と共に反応させて完全に還元した。生成物を THF 中 80°C で TBAF によって脱保護し、減圧下溶媒を除去した後、エチルアセテートと水で分別した。水層を濃縮し、水で平衡化した Dowex 50W-X8 カラムにアプライしてから、15% NH_4OH で溶出した。主生成物 (20% メタノール-クロロフォルム中で、 $R_f = 0.3$) は、上述の De Clercq らの方法を用いて

調製された 2'-デオキシフォルマイシン A の精製物と同一であることが、プロトン NMR と元素分析によって判明した。

(IV) 7-アミノ-3-(2'-β-D-リボフラノシル)ピラゾロ[4,3d]ピリミジン-5'-トリフォスフェート(7-amino-3-(2'-deoxy-β-D-ribofuranosyl)prazolo[4,3d]pyrimidine-5'-triphosphate)(2'-デオキシフォルマシン A-5'-トリフォスフェート(2'-deoxy formycin A-5'-triphosphate))

2'-デオキシフォルマイシン A の 28 mg (0.11 mmol) を、ガラス

栓付き試験管中に加え、リエージェントグレードのアセトン0.2 mL、フォス
 フォラス オキシクロライド (phosphorous oxychloride) 0.1 mLと混合し
 た。異種反応混合物を、溶液が深黄色である間、24時間4°Cで保存した。冷
 却し、3 mLのアセトンを加えた後、濃NH₄OHの6 mLを、攪拌しながらす
 ばやく加えた。アセトンを減圧除去してから、pHを2以下に下げ、混合物を1
 .5時間還流し、希釈してからDowex 1-フォルメイトに直接アプライした
 。そこから、2'-デオキシフォルマイシンA-MP (2'-deoxyformycin A-MP
)を、0.75 Mのギ酸で溶出した。2'-デオキシフォルマイシンA-MPは
 、Yoshikawaらの方法 ([1967]Tetrahedron Lett. 5095)で、トリフォ
 スフェイトに変換した。

(V) 7-アミノ-3-(2'-デオキシ-β-D-リボフラノシル ピラゾ
 ロ[4,3d]ピリミジン-3'-O-フォスフォルアミダイト(7-amino-3-(2'
 -deoxy-β-D-ribofuranosyl)pyrazolo[4,3d]pyrimidine-3'-O-phosphoramidit
 e)(2'-デオキシフォルマシンA-3'-O-フォスフォルアミダイト(2'-deo
 xy formycin A-3'-O-phosphoramidite))

2'-デオキシフォルマイシンAは、DMTによる5'-O-保護と、通常の
 方法による7-アミノ基のベンゾイル化がなされるよう処理された。ジクロロ
 メタン1.5 mL中で、生成物の0.3 mmolと25 mgのジイソプロピルア
 ンモニウム テトラゾライド (diisopropylammonium tetrazolide) に対し、0
 .33 mmolのO-シアノエチル-N,N,N',N'-テトライソプロピル
 フォスフォロジアミダイト (O-cyanoethyl-N,N,N',N'-tetraisopropylphosphoro
 di

amidite)を含む溶液を加えた。混合物を4時間攪拌し、ジクロロメタンで抽出
 し、飽和NaHCO₃水溶液中で冷却した。ジクロロメタン層を飽和食塩水で洗
 い、Na₂SO₄で脱水し、ろ過してから濃縮した。25 mmカラム(9:1のC
 H₂Cl₂/Et₃N)中、塩基性アルミナの2"プラグを通する過による精製は
 、フォスフォルアミダイトを与えたが、これを泡状になるまで乾燥させた。生成
 物の同定は、プロトンNMR、元素分析、ヘテロサイクルの蛍光、オリゴヌクレ

オチド合成に使用することなどで確認した。

例2 RNAまたはDNAプローブにおけるFTPまたは2' dFTPによるATPまたはdATPの酵素的な完全な置換

A. リボースオリゴマーの対称合成 (Symmetric synthesis) RNAオリゴヌクレオチドを、Wardらによって原著論文が報告されているように、3つのDNAテンプレート(図12)から合成した。これに用いたのは、(i) ATPの置換体としてのFTP (F_{105})、(ii) E.coliから精製したRNAポリメラーゼである。Wardらの論文と違う点は、合成が、反応が止められるまで37°Cで3時間行われたことである。FTPは、効果的にATPと置換したが、他の3種類の通常のヌクレオチド、すなわちCTP、UTP、GTPはいずれも置換しなかった。

合成の最後に、pH7の飽和食塩水中、4°CでSephadex G-50を用いて、反応生成物を未反応の試薬から分離した。未反応の試薬から反応生成物を単離するスキームは、図19にフローチャートとして示してある。

この反応において、FTPは、合成オリゴヌクレオチドポリマーテンプレートと同様に未変性、及び変性したDNAと同様に、RNAポリメラーゼに対し共に用いたときの、効果的な置換体である。CTP、UTP、GTP、RNAポリメラーゼ、DNAテンプレートのひとつFTPまたはATPのどちらかなどを含むサンプル中で、高分子量の生成物が、空隙容量においていずれのサンプルからも溶出されてきたが、その一方で、両サンプルの保留されたフラクション中の単量体NTPの量は、それぞれ70%以上に減じた。酵素フリーのコントロールから溶出された少量のテンプレートと未反応のrNTP以外に、高分子量分画は、減

少しなかった。同様に、テンプレートフリーのコントロールは、保留された体積中で通常のリボヌクレオチド トリフォスフェイトと同時に溶出されてくる未反応のrNTPしか含んでいなかった。同様の結果が、天然の、あるいは合成したさまざまなDNAテンプレートから得られたが、そうしたDNAテンプレートは、別々のコポリマーであるポリd(AC)、ポリ(AG)、ポリ(ACGT)を含んでいる。更に、高分子量オリゴマーが、(i) N-ヌクレオシドアナログ、

すなわち 2, 6-ジアミノ-アデノシン-5'-トリフォスフェイト (2,6-diamino-adenosine-5'-triphosphate)、または 2-ジアミノ-アデノシン-5'-トリフォスフェイト (2-diamino-adenosine-5'-triphosphate) が反応液中で ATP と置換し、あるいは (i i) C-ヌクレオシド、すなわち フォルマイシン B-5'-トリフォスフェイト (formycin B-5'-triphosphate) (F_bTP)、または -アミノ-フォルマイシン B-5'-トリフォスフェイト (-amino-formycin B-5'-triphosphate) (aF_bTP) がテンプレートとなったような合成から、良い収率で得られた。テンプレートが何であれ、ATP または GTP に対するデアザー、またはアザーヌクレオシドアナログの幾種類かの置換によって得られた収率は、極めて低かった。

B. RNA または DNA プローブの非対称的合成 (Asymmetric synthesis)

試験管内で、DNA 依存的な RNA ポリメラーゼの転写システムは、基質及びハイブリダイゼーションのプローブとして用いられる RNA の合成に使われるが、これは、分子生物学においてごく普通に用いられる道具である。このシステムが、本発明において、自動蛍光プローブとその生成物という独特な形で応用された。本発明で展開された方法は一般的であり、SP6、T7、T3 などを含むあらゆるファージポリメラーゼシステムにも応用される。今回のケースでは、本発明は一对のプロモーターを採用しているが、このプロモーターは、図13に示したように、二重鎖プラスミドの別々の鎖に別れて存在し、ポリリンカーの互いの末端に位置している。ベクターは、(i) プロモーターのひとつを認識する活性ポリメラーゼの使用を通じて、非対称合成に影響を及ぼすことが可能なプロモーターに結合するために、また (i i) 蛍光プローブあるいはプローブの標的の非蛍光のコピーの非対称的合成に用いられるテンプレートの複数のコピーを複製するた

めに、用いられる。DNA の標的の配列のコピーは、プロモーターのひとつの近傍の制限サイトに、二重鎖の形で、ポリリンカーに挿入される。コンピテントセル中でのプラスミドの複製は、転写のためのテンプレートの莫大な量を与える。ふたつの別々な、しかしパラレルな方法が、DNA プローブの非対称的合成に関

して発展してきた。最初の方法では、ssDNAプローブが、図14に示したように、5'末端にプライマーの結合部位を有するテンプレートから合成される。そうした合成においては、プライマーは非蛍光でよいが、あるいは図の左に示したように、蛍光アナログのフォスフォルアミダイトを用いて合成してもよい。このバリエーションは、非対称増幅と分離である。そこでは、テンプレートの両鎖が、蛍光オリゴマーのように増幅されることによって複製される。ここで用いられるのは、変性させたセンス鎖及びアンチセンス鎖を分離するのに用いられるビオチンのように、一時的に親和性があるリンカーを、ひとつの、そしてそれだけが持っているようなプライマー対である。

RNAプローブとDNAプローブの両方に対し、全ての転写とプローブ検出能が測定されているような、リファレンスとなるテンプレート、プローブ配列、標的配列を確立することが有用であることが判明した。Xenopusの翻訳伸長因子(Xef-1 α)のアルファ鎖が役に立つこととはすなわち、目的と、非対称RNAプローブ合成が、本発明において、全RNA及びDNA合成の指標として用いられているということである。Xef-1 α のmRNAは、Xenopusの胚における主要な転写産物であるが、その胚は、中期抱胚過程後に直ちに現れる、非常に多くの非ミトコンドリアルmRNA転写物を含んでいる。Xef-1 α の遺伝子は同定されており、cDNAライブラリーの構築を通じて、EcoRI認識部位がクローンの末端に付け加えられている。1705塩基対の断片を、一方の鎖にT7プロモーターを、その相補鎖にSP6プロモーターを持っているようなプラスミドpSP72に挿入した。プラスミドの複製とテンプレートの直鎖化に続いて、T7RNAポリメラーゼ、rNTPすなわちシチジン、ウリジン、グアノシンそしてフォルマイシンAかアデノシンのいずれかのリボーストリフォスフェイトを用いた転写によって、FあるいはA残基のいずれかを含むような1749塩基長のオリゴマーを生成した。全長より短い転写産物は全く検出されなかった。それ

ぞれの場合において、類似及びコントロールのオリゴマーは、比肩し得るだけの量が生成され、また、類似の塩基配列が恒久的に蛍光を有することを除き、物理

学的挙動に関して、あらゆる意味で区別が不可能であった。

この新規な合成システムには、独特な試みが2つ存在する。(1)アンチセンス鎖の合成(例えば、SP6と通常存在する非蛍光rNTPを用いる)が、高収率標準化された標的配列を与える。これに対応するDNAプローブの非対称的合成においては、相補テンプレート鎖上の異なるプライマーサイトを、同じ目的を達成するのに用いることが可能である。(2)いく種類かの異なるプラスミドを含んでいるようなプラスミドの混合物は、直鎖化されたテンプレートの"カクテル"を作るために用いることが可能である。そこから、対応するプローブの"カクテル"(以下の「例7」を参照)を、同時に翻訳することができる。このプローブは、ゲノム配列上の、複数の部位に結合することができるのである。

例3 ヌクレシチドアナログRNAプローブの蛍光および溶液中での該プローブのハイブリダイゼーションの確認

例1に記載されたように、ポリd(AT)に導かれる合成において、FTPを効果的に利用することで、およそ300-500塩基の長さのポリマーを合成したが、これは、加水分解及び/または配列決定された際、ポリ(FU)という配列を除いて、DNAテンプレートの全く別の複製物であると判明した。この配列から予想されたように、生成物は、1度のサーマルサイクルによって、似た配列にアニールすることが可能だった。そのために、推定上の生成物、すなわちポリ(FU):ポリ(FU)を考えたが、比較し得る処置を施したポリ(FC)と違って、それは予想されたようなセルフハイブリダイゼーションの証拠を示さず、アガロースゲル中でエチジウムブロミドによって染色され、吸光と蛍光の両方で鋭い熱転移を与えたポリ(FU):ポリ(FU)のアニールしたハイブリッドは、プローブが効果的かつ特異的にハイブリダイズするということを示している。精製したポリ(FU)、ポリ(FC)、ポリ(FG)、ポリ(UFb)、ポリ(CaFb)、ポリ(FCGU)の吸光と発光スペクトルは、精製したポリ(AU)、ポリ(AC)、ポリ(AG)、ポリ(TG)、ポリ(ACGT)のコントロール

の吸光及び発光スペクトルと、4つの点に関して異なっている。(i)遠UV吸

光の最大値が、比較物の265nmに対しコントロールの260nmというように、わずかにシフトする。(ii)340nmのわずかな吸光ピークの近傍である290nmと320nmの間に、重要な強い構造的吸光(室温で3本のピーク)が存在する。(iii)最大励起は303nmで見られる。(iv)405nmのピークに、可視波長域にまで広がる幅広い発光バンドがみられる(Stokesシフト=102nm)。蛍光が、例えばポリ(FU):ポリ(FU)ハイブリッドにおいて完全にクエンチされ、溶液のpHをpH10以上にまで上げて鎖を変性させるまで検出されない、ということは、重要な特性である。ひとたび変性されたならば、360nmから460nmにまたがる範囲のピークの強度の相対蛍光強度40%以上において、オリゴマーの蛍光は完全に積算可能である。

表1. poly(AU)とpoly(FU)とによる複合体形成の特徴						
RNA:RNA複合体	変性複合体			変性していない複合体		
	最大波長			鎖長(塩基対)	エチジウムブロマイド染色	溶融温度
	吸収	励起	放出			
r[AU]:r[AU]	260nm			150-300	yes	32℃
r[FU]:r[FU]	266nm	303nm	405nm	150-300	yes	33℃

例4 標的RNAと標的DNAへの蛍光プローブのハイブリダイゼーション; 固相における検出を可能にしたリンカーの使用

合成テンプレートポリ(TG)を、相補的なRNAプローブ、ポリ(AC)とポリ(FC)(いずれも自己相補的ではなく、いずれにおいてもハイブリッドはアニールできない、または検出できない)を生成するために用いた。2つのうち、ポリ(FC)だけが蛍光を有する。パラレルな実験であるが、ビオチン化した合成22量体のプライマー、⁵#BIOTIN-(TG)₁₁3'を用い、通常のポリメラーゼチェーンリアクション(PCR)法によって、ポリ(AC)テンプレートを増幅し、⁵#BIOTIN-ポリ(TG)3'という配列を有するDNA増幅体を合成した。続いて、ゲルサイジング及び/またはQEA Eイオン交換クロマトグラフィーによって、未反応のプライマーから分離した。その後、ポリマーを、

P-ATPと酵素ポリヌクレオチドキナーゼを用いて放射能ラベルした。ビオチ

ン化したアンプリマー、 $^5\text{HBIOTIN}$ -ポリ(TG) $^3'$ 、RNAプローブの両方、そしてポリ(AC)とポリ(FC)を、等量ずつ別々に混合した際、(i)エチジウムブロミド染色、(ii)融解の挙動によって、形成したハイブリッドを区別することが可能であったが、予想されたように、ポリ(FC)プローブの蛍光は、ハイブリダイゼーションによってクエンチされた。ハイブリッドは、半分の $^5\text{HBIOTIN}$ によってアビジン化したベッドに吸着することができ、洗浄によってハイブリダイズしていないポリ(FC)を除去し、放射活性と蛍光を等量アッセイした。洗浄したサンプルの変性以前には、溶液中の検出可能な蛍光はきわめて小さかった。高いpH緩衝液中で変性したとき、すでにハイブリダイズした(これは、プローブの標準化された希釈の蛍光から測定した際のことであるが)ポリ(FC)の量は、標的DNAである $^5\text{HBIOTIN}$ -ポリ(TG) $^3'$ の量の1%以内でしかなかった。これらは、サンプル中の放射活性ラベルの量を、標準化された希釈液との比較によって測定した結果である。

例5 標的DNAに対するヌクレオシドアナログ-3'-0-フォスフォルアミダイト (Nucleoside Analog-3'-0-Phosphoramidites) から合成された蛍光プローブのハイブリダイゼーション

蛍光ヌクレオシドアナログのフォスフォルアミダイトを用いることを示す実験においては、25量体から60量体といった5塩基の倍数の長さで、また(AC) $_x$ あるいは(FC) $_x$ (ここで $X = 12.5, 15, 17.5, 20, 22.5, 25, 27.5, 30$)といった配列を有するn量体を、パラレルに合成した。その際に、デオキシアデノシン-3'-O-フォスフォルアミダイト(dAdenosine-3'-0-phosphoramidite)か、デオキシフォルマイシン-3'-O-フォスフォルアミダイト(dF-3'-0-phosphoramidite)のいずれかを、デオキシシチジン-3'-O-フォスフォルアミダイト(dC-3'-phosphoramidite)とともに、ファルマシアLKB ジーンアッセンブラー中で用いた。固定面からの脱着とQEAE-セファロースによる精製の後、決まった長さの蛍光オリゴマー(FC) $_x$ を放射能ラベルされたポリ(TG)のアンプリマーにハイブリダイズした。このポリ(T

G) は、上述の実験例及び3から得られ、DNA融解の挙動、臭化エチジウム染色、クエンチされた蛍光体がハイブリッドの変性によって再び蛍光活性を持つことなどによって検査されたものである。

例6 FTPで置換されたRNAプローブを用いたChlamydia trachomatisのアッセイ

Chlamydia trachomatisは、その活動的な感染期において、細菌1個あたり 3×10^3 から 4×10^3 コピーのリボソームRNA (rRNA) と、1コピーのゲノムDNAを含んでいるような、完全に細胞内で生育する病原因子である。1対のプライマー（そのうちのひとつは、ハイブリダイズするプライマー配列に対して5'末端であるような5'-ビオチン化したT7プロモーターを含む）を使用して、C. trachomatis L2の保存株から得たMOMP遺伝子の150塩基対のDNA断片を増幅した。DNA断片のおよそ500 ng（これは、5'末端にT7 RNAポリメラーゼのプロモーター部位を含んでいる）を、rCTP、rUTP、rGTP、rFTPかrATP（+コントロール）のいずれか一方、などの存在下にT7 RNAポリメラーゼを用いることによって、転写した。100°C、3分間加熱して酵素を失活させることで、反応を止めた。反応しなかったrNTPは、Sephadex G-25上でのゲルサイジングクロマトグラフィーによって、ラベルしたRNAから分離した。その後、プローブの濃度を260 nmでの吸光によって、測定した。単純なデュアルモノクロメーター・蛍光スペクトロフォトメーターを用いて、RNAプローブのわずか 5×10^{-14} モルを、バックグラウンドから識別することが可能であったが、この際に、20 nmのスリットを、励起と発光モノクロメーターの両方に用いた。感受性を高めるために設計された光量子計測フルオリメーター（後述の例9を参照のこと）が、同じプローブの 5×10^{-16} モルから 5×10^{-17} モルを検出するのに有用である。このプローブは、5000から50000個のバクテリアから得られることが期待されるリボソームRNAの量に等しい。(i) C. trachomatisのゲノムDNA、あるいは、(ii) 増幅された標的DNAのいずれか一方200 μ lを、ハイブリダイゼーション緩衝液（0.15 M NaCl、0.02 M クエン酸ソーダ (sodium citrate)、0.02 M

HEPES、0.004 M EDTA、pH 7.4) 中で、プローブの1/200希釈したもの200 μ lを混合し、それを3分間煮沸した後、1時間以上かけて室温で徐々に冷却した。ゲノムDNAサンプルのアリコットを、ウルトラフィルトレーションマイクロチューブまたは96穴フィルタープレート(ポアサイズ=0.1 μ m)に溶出したが、これは図17に示した通りである。0.15 M NaCl、0.02 M クエン酸ソーダ(sodium citrate)、pH 7.4の洗浄液で5回洗い、サンプルを2つに分けた後、一方を高pHで変性し、両アリコットを走査して蛍光のバックグラウンドとハイブリダイズしたプローブの蛍光を、それぞれ測定した。標的DNAのアンプリマーを同様に処理したが、その際、以下の点だけが異なっている。すなわち、標的DNA断片の5'-ビオチン化したプライマーを、アビジン化磁床(直径2.8 μ m)に最初に吸着したため、材料を損失することなく、洗浄することが可能であった(図18)。いずれの処理においても、プローブの蛍光は、標的DNAを 1×10^{-16} 以下しか含まないようなサンプルの希釈液からも検出されることが予想されるが、これは、同じようなサイズの1本のプローブを感染Chlamydiaから得られたrRNAの検出に用いた場合に、10000個以下のバクテリアを検出する際に必要とされる検出能力と、ほぼ同等である。ここで用いたプローブは約150塩基の長さであり、プローブあたりおよそ38個のフォルマイシン残基を含み、リボソームRNAのそれぞれのコピー上にある唯一の標的部位だけに結合する。プローブあるいはプローブ"カクテル"中の蛍光担体数の増加が、検出能力を増大させるということは、本発明の重要な点である。150塩基のMOMP遺伝子に対し、プローブあたりのフォルマイシン残基が13倍の場合に、Xef-1 α プローブの 1×10^{-18} モルを、デュアルモノクルメーター・蛍光スペクトロフォトメーターを用いて検出することが可能であるが、これに対して、例9に記載したように、光量子計測技術を用いれば、 1×10^{-20} モル以下を検出することもできる。

例7 複数の標的部位の検出

診断及び治療、例えばアンチセンスなど、その双方への核酸の応用に対する非対称合成の重要な点は、プローブ"カクテル"を同時に合成する能力である。こ

こで、このプローブ”カクテル”には、長さ、その位置、あるいはそれらが結合するRNAまたはゲノムDNA上の標的部位の数が、それぞれ異なるプローブが含まれている。3種類の異なるタイプの診断標的に対するプローブカクテルの利用例が、本発明の幅広い重要性を示している。

A. マルチコピーで存在する単一の標的核酸

ある種の病原体のなかには、複数のコピーのrRNAをそれぞれの個体を持っているものもある。例えば、*Chlamydia trachomatis*のバクテリアは、その個体あたりおよそ 2×10^4 のrRNA分子を含んでいる。*Chlamydia*のrRNAは通例3000から5000ヌクレオチド長の間であるから、診断的検査における検出能力は、rRNA上の標的配列に対する特異的な、また、5から10もの異なったプローブ配列から成るプローブカクテルを用いることで、大きく増加するだろう。それら相異なるプローブそれぞれは、図20に図示されているダイアグラムの下半分にあるプローブ(a)から(e)に示してある、標的rRNAまたは標的DNAの独立した部分に結合することができる。この図の中で、(a)、(b)、(c)、(d)、(e)は、一方のDNA鎖の相異なる標的配列に特異的な、類似した相補的プローブである。

診断の標的としてrRNA配列を用いるのには、二つの不利な点がある。

(i) rRNA配列は高度に保存されており、それ故、さまざまな短い配列だけが、感染性病原体の検出と同定に有用である。この、診断の検出能力に対する影響のひとつは、ごく限られた数の”レポーター”ラベルのみが、それぞれのプローブに用いることができ、それゆえ検出能力に限界がある、というものである。

(ii) ごくわずかの病原体のみが、rRNAを高コピーで保持しており、多くの病原体が、例えばDNA性ウイルスのように、全くrRNAを保持していない、それゆえこの方法を採用できる診断の種類が限られてしまう。

B. 一本鎖DNA上の複数の異なった標的配列

あらゆる生物のゲノムはrRNAよりもはるかに巨大であり、通例、より大きく、独特の配列を数多く保持している。この配列は、核酸プローブハイブリダイゼーションの標的配列を提供し得るものである。例えば、*Chlamydia trachomatis*の完全なゲノムがすでに単離されており、分子量が 660×10^6 以上の、ある

いは 1×10^5 よりやや長い塩基長の、比較的小さい二重鎖DNAから成っている。それぞれの細菌細胞もまた、7000以上の塩基を含む 4.4×10^6 ダルトンのプラスミドを保持している。この種のrRNAと違って、プラスミドは、その全体を通じて、chlamydiaに対して独特の配列である（例えば、Neisseria gonorrhoeaから得られたDNAでは、クロス-ハイブリダイゼーションは検出されない）。確かに、プラスミドそれ自体の相異なる制限断片間では、クロス-ハイブリダイゼーションはおこなない。ハイブリダイゼーションの標的として用いるために選ばれたChlamydiaのゲノムDNAの他の部分がないときでさえ、Chlamydiaプラスミドだけの複数の制限断片に特異的なカクテルは、少なくとも4つ以上のXef-1αのプロープに対して、長さに関して同等であり、100から1000個の細菌細胞に同等のレベルで検出することが可能である。

C. 一本鎖DNA上のマルチコピーの単一の標的部位

いくつかの遺伝子の両側に隣接する配列が、タンデムリピートの中程度のものから長いものまでを含んでいることが、ごく最近になって発見された。リボソーム遺伝子のリピートは、本発明に記述されるDNAを利用する診断の類に、特に興味深いものである。リボソーム遺伝子のように、それらは高コピーで存在し、検出の感受能を改善するが、加えるに、遺伝子間のスペーサー領域は、種によってきわめてさまざまであることが普通である。というのも、それらは選択圧を受けにくいからである。一本のDNA鎖上の同じ独特な配列の複数のコピーは、そのなかではハイブリダイゼーションの標的はそれぞれのゲノム上の部位のカクテルであるという、特別なケースを意味している。つまり、ひとつのプロープ配列は、同じ配列の、また同じDNA鎖上の複数の標的部位を調べることができる。それらは、特異的プロープの標的のための種や属として、理想的にふさわしいものである。

そうしたプロープと標的の典型的な例が、さまざまな家畜に球菌感染症状をひきおこす、原生動物の寄生生物であるEimeriaの異なる種に対して示された。E. tenellaから得られたゲノムDNAをいくつかの異なる制限酵素で切断し、断片を適当に切断した非対称プラスミドベクターに結合して、それを用いてEscherichia coliを形質転換した。ランダムプライミングによって ^{35}S にラベルされたEime

*ria tenella*のゲノムDNAとのハイブリダイゼーションによって、コロニーを、反復配列に関して、スクリーンした。強くハイブリダイズするクローンを取り上げ、スクリーニングにかけた。このときに用いた、ラベルしたゲノムDNAは、*E. mitis*、*E. maxima*、*E. acervulina*、*E. tenella*から得たもの、ならびに近隣の属である*Plasmodium*、*Trypanosoma*、*Sarcocystis*から得たDNAであった。クローンの大部分は、他の属から得たDNAと同じ強さのシグナルを与えた。しかしながら、いくつかのクローンは、*Eimeria*によって特に強く認識されたし、また、*E. tenella*によってのみ認識されたクローンも1つある。

後者のクローン中で挿入された配列の完全なものは、334塩基対を含んでいる。制限断片の物理学的キャラクタリゼーションが示していたことは、以下の通りである。すなわち、配列はおよそ738塩基対のタンデムな繰返し単位中に存在する。また、最低30個の遺伝子がタンデムにリンクしており、全てがひとつの染色体上にあることがわかった。タンデムリピートをテンプレートとして用いて合成した非対称プローブは、テンプレート配列あたり179個のフォルマイシンA残基を含んでいる。

ハイブリダイゼーションの標的として用いるために選ばれた*Eimeria*のゲノムDNAの他の部分がないときでさえ、*Eimeria*ゲノム上のタンデムリピートの複数のコピーだけに特異的な配列のプローブは、少なくとも11個以上のXef-1 α のプローブに対して、長さに関して同等である。*Eimeria*の感染性粒子は卵であるから、そのひとつひとつが8個のゲノムを含んでおり、そうした標的のカクテルは10個以下の卵の検出を可能にする。タンデムリピートを導入することは、検出能力を高めることになるが、しかし、あるいは、このひとつの属の検出を簡単にする。というのも、タンデムリピート配列は、広くさまざまな種と属のゲノムDNA中に存在するからであり、同時にこれらの種で異なるからである。それ故、広範囲に及ぶ病原体の診断検査の設計の、幅広い基礎を提供するものであり、診断のためのrRNA標的が存在しないようなものも含んでいる。

例8 ライゲーションまたは化学的結合による非特異的およびハイブリダイズしない蛍光オリゴマーのユニバーサル蛍光"タグ"としての利用

3'、5'、あるいは3'と5'末端の両方に"粘着末端"(例えば、5'ACGT-ポリd(AT)、ポリd(AT)-TGCA^{3'}、あるいは5'ACGT-ポリd(AT)-TGCA^{3'}など)を作るための、テンプレートの簡単な変更によって、上述の特性を全て有する核酸プローブを合成することが可能になったが、それは(i)より長い蛍光プローブを作るような鎖、または(ii)指示されたターゲットDNAに特異的な他のハイブリダイゼーションシーケンスのどちらかに対して接着させることも可能であった。あらゆるクローン化されたDNA断片の普遍的なラベルを作ったり、その末端で高い蛍光活性を有するがどちらの鎖もハイブリダイズしないシーケンスを同定するためのプローブを与えたりする場合に、後者は、特に有効な方法である。その際には、これまで述べてきたように、単純なポリ(FU)において見られた、検出のためのハイブリッドの変性を必要としない。同等の非ハイブリダイジングユニバーサルプローブを、化学合成によって作ることがすでに可能である。この化学合成においては、例えばエテノアナログフォスフォルアミダイト、例えば、1, N₆-エテノアデノシン-3'-O-フォスフォルアミダイト(1, N₆-ethenoAdenosine-3'-O-phosphoramidite)(eA)を、続いてあらゆるハイブリダイゼーションプローブにリンクできるような非特異的タグを合成するのに用いた。

また、そうしたユニバーサルプローブの3'あるいは5'末端を、他のオリゴマーや固相に、酵素的というよりもむしろ化学的に結合するために、備えることも可能である。その際に加えるのは、5'-アミノヘキシル(5'-amino hexyl)、5'-サルフィドヒドрилヘキシル(5'-sulfhydryl hexyl)、3'-アミノヘキシルアミノ(3'-aminohexyl amino)、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(N-hydroxysuccinimide esters)、そして他のそうしたリンカーである。このプローブ技術の独自の応用(ユニバーサルエンドラベルを採用している)は、定量的であり、高い感受能を必要とするルーチン検査において、よく機能する。本稿で"持続型シグナル増幅"として言及されているこの技術の別の応用は、非定量的であり、ある遺伝子マーカーがはたして存在しているのかどうか、正しいか否かの答を得るために、極端な感受能が要求されるような状況において有用である。例えば、低コピー数の標的配列があるような場合である。"持続型シグナル増幅

は、以下の例8(B)に、より詳細に記述してある。

A. 5' ユニバーサル末端標識

例えばエテノアデノシン (ethenoadenosine) のように、蛍光ヌクレオシドアナログに非水素結合しているホモポリマーが、小プローブ (配列決定の際の小断片上で) のカクテルの蛍光ラベルの強度を増大するため、また、小さい、あるいは低コピー数の標的のラベリングの感受能を増大するために、一本鎖DNAとRNAの非対称合成とともに用いられた。総体的な概念は、オリゴマーのプローブを含んでいが、このオリゴマーは、典型的なフォスフォジエステル骨格をもとに構築されたものである。しかし、それは、異なる機能領域-5' 蛍光ホモポリマー、プライマーまたは相補的なプロモーター、オプションな"ティーザー" 領域 (これは、ホモポリマーをプライマーに結合させることができる)、そして相補的な標的に分配することが可能である。ここに記述された5' ユニバーサルエンドラベルのダイアグラムは、図22に示してある。

図22に示されたフォスフォジエステル鎖の機能領域は、

A = 1 からおよそ50の蛍光ヌクレオシドアナログの非塩基対ホモポリマー。

B = 例えば、オリゴマーのフォスフォジエステル骨格の一部に挿入された、ひとつ、またはそれ以上の自由回転するアルキル鎖を含む、オプションな非ヌクレオチドフォスフォジエステル"ティーザー"。

C = 標的特異的なD領域の酵素合成をはじめる際に用いる、酵素合成プライマー。典型的な例は、本稿に記述されている、非対称RNAまたはDNAプローブ合成に用いられたような、T7 RNAポリメラーゼのプロモーター、あるいはM13フォワードプライマーに相補的な配列であろう。

領域A、B、Cは、代表的なものは20から60塩基長であるが、化学的に合成することが可能である。5' ユニバーサルエンドラベルは、すくなくとも領域A、Cを含み、あるいは、オプションな領域Bを含み得る。

D = 40から20000のヌクレオシド長の、標的に相補的な配列。この配列は、蛍光ヌクレオシドアナログを含んでいてもよいし、含んでいなくてもよいが

、主としてプロモーターあるいはプライマーサイト（これに対して、領域Cは補助的である）に隣接するテンプレートから合成された領域として、機能する。

5' ユニバーサルエンドラベルを用いた酵素的合成は、*M. tuberculosis* IS6110のテンプレート（その最近に独自の配列）を用いて示してある。このテンプレートは、合成テンプレートを作るために、標準的なジェミニプラスミドに挿入してある。他のプラスミドも、同様に用いることができる。この酵素合成のプロセスは、図23に示してある。以下に挙げた、5' ユニバーサルエンドラベルに有利な点もまた、発見されている。

(1)図24に示したように、ひとつの非水素結合蛍光アナログ、エテノアデノシンの励起スペクトル（ F_{185} と示されている）が、比較対象であるフォルマイシンの励起スペクトル（ F_{105} ）と、比較されている。二つの重要な発見が、 F_{185} の励起と発光スペクトルの両方から見いだされた。（i）波長の最大値は、pH7とpH11の両方で等しい。（ii）量子収量は、 F_{105} がpH7とpH11それぞれにおいて示している0.55、0.65という値の10倍以上。これは、5' ユニバーサルエンドラベルを、幅広いpHコンディション下で用いても良いということであり、より少ない蛍光担体の総量から、はるかに強い蛍光を引き出せることができる、ということである。pH11で、 $270\text{ nm} \leq \lambda \leq 310\text{ nm}$ の範囲で励起する F_{185} の20マーが、3から10の蛍光分子へのラベリングに相当するということが、示されている。更に、蛍光はクエンチされず、時間分析分光に用いることが可能である。

(2)非塩基対末端ラベルは、プライマーが介在するDNAの増幅、または複製に干渉しないし、 10^{-3} M までの濃度では水に可溶であり、また結合試験の際に、非標的配列に対する非特異的ハイブリダイゼーションによるバックグラウンドを増大させることもない。

(3)そうしたプローブは、化学的に合成したプローブの能力を上回っている。というのも、こうした技術においてよく知られているように、満足できるような収率における合成の実用上の限界は、およそ60塩基にとどまっているからである。5' ユニバーサルエンドラベルは、“D”領域の長さがおよそ100塩基で

あるような、相対的に短いプローブのカクテルを用いることで、検出の感受能を増大することが可能である。具体例を挙げるなら、図25に示したように、*M. tuberculosis* IS6110の塩基配列1361bpが、10種のプローブのカクテルに

対する標的として用いられたが、これらはそれぞれが、相異なる”D”部分か、あるいは標的に相補的な配列を有している。しかし、それぞれのプローブは、同じ5'ユニバーサルエンドラベルを保持している。*M. tuberculosis*の場合、細菌細胞1個体あたりIS6110の遺伝子は16コピー存在する。図25に示された方法で末端ラベルを用いることによって、それぞれの細菌が、恒久的な蛍光担体を有するプローブカクテルによってラベルされるという可能性を有するようになった。この蛍光担体は、480から1600の蛍光分子が同時に発光することに相当する。

(4)同じラベリングの計画を、標準的なDNA塩基配列決定における標準化された蛍光ラベルの供給に用いることが可能であるが、すでにラベルされたDNA断片を有しているので、配列をゲルから直接読むか、記録することができる。そうした使い方は、図26に示している。

B. 持続するシグナル増幅(SSA)

5'ユニバーサル末端標識が、こうした状況において特に有用であることが判明するであろう。検出の極めて高い感受レベルが要求されるような応用、あるいは極めて小さい標的が存在するような場合の応用において、蛍光ラベリングとシグナル複製あるいは増幅のある組み合わせが、求められる。B型肝炎がそうしたケースにあたる。B型肝炎ウイルス(HBV)の全ゲノムはわずか3200塩基長であり、ウイルス粒子の内部では、鎖のひとつは、更に短い。ウイルス粒子は、宿主細胞から得たヌクレオチドトリフォスフェイトを利用して、感染の初期段階として短い鎖を完成させるような、DNAポリメラーゼを含んでいる。

本稿に記載されている新規蛍光ヌクレオシドアナログと共に用いられる、ウイルス粒子中のDNAポリメラーゼを、非PCRタイプの増幅に組み合わせたが、これは、今までRNA複製にしか用いられていなかったものである。このスキー

ムにおいては、図27に示されているように、ウイルス粒子のDNAはin situ テンプレートとして供与され、上述した非対照合成法と組み合わせることで、蛍光シグナルの強度の増大に用いることができる。そのプロセスは、図27に言及することによってより理解されるはずであるが、ふたつのステップから成っている。

最初の段階は、サンプルDNAを (i) 三リン酸化された蛍光ヌクレオシドアナログを含むデオキシヌクレオチドトリフォスフェイト (deoxyNTPs) と、(ii) ふたつのプライマー (図27においてA及びBと示されている) とに結合させる。その最初は、その5'末端に、RNAポリメラーゼプロモーターに対し相補的な配列を有している。この実験例において言及されているプライマーは、ふたつの分離したプライマーを用いることを示すため、"A" 及び "B" として記述されている。これらは、説明を目的とするために記述されたのであり、そうしたものは、本技術の熟練者には、あらゆるプライマーに言及していることが、理解されるであろう。このプライマーとは、標的配列上のプロモーター領域に相補的な配列を含み、また、核酸ポリメラーゼとともに用いることができる。図27に示されている説明において、T7RNAポリメラーゼプロモーターは、プライマーAの末端に、太線で表現されている。はじめにサンプルを、ウイルスDNAポリメラーゼが短いゲノム鎖を完成できるように、10分間37°Cでインキュベートしてから、ゲノムを変性させるために、1分間65°Cに上げ、その後、42°Cでプライマーをアニールさせた。次の段階は、二種類の酵素、すなわちリバーストランスクリプターゼとT7RNAポリメラーゼを、蛍光リボヌクレオシドアナログを含むリボースNTPと共に加え、サンプル全体を1時間42°Cでインキュベートする。これは、図27の下半分に示したように、DNA鎖とRNA鎖のサイクル合成となっている。ネット効果によって、 10^8 から 10^9 の蛍光RNA鎖と、そのおよそ100分の1以下の蛍光DNA鎖が生成する。未使用の単体蛍光NTPを除去するため、セルフリーな状態の中でサンプルを洗浄することに続いて、サンプル中になんらかのテンプレート (この場合はB型肝炎DNA) が存在するかどうかを決めるために、蛍光によってサンプルを読

むことが簡単にできるのである。

例9 時間分解フルオロメトリーを用いた蛍光プローブの定量

結合した蛍光オリゴヌクレオチドプローブの蛍光ヌクレオシドアナログ、蛍光オリゴヌクレオチド、あるいは類似な配列を検出する新規な方法を、サンプル中の蛍光単体の量を測定する光量子計測を使用することを基礎として、発展させた

が、この方法を以下に述べる。この方法は、蛍光担体または核酸プローブからの全蛍光発光を総和するという点において、また蛍光の波長の独立性において、更にいずれも時間とスペクトル総和の新規な組み合わせであり、診断検査、あるいは治療的処置に対する同定、検出、核酸標的配列の定量を行うための光量子計測の新規応用であるという点において、時間分解分光分析とは異なっている。

あらゆる発光の計測に用いられる基本的な実験パラメーターは、発光の強度1である。その単位は、毎秒毎リットルあたりの光量子のモル数である。ここで用いた蛍光ヌクレオシドアナログは、全ての実用上の目的のため、恒常的に蛍光を有し、通常の測定におけるライフタイム間では光退色しないので、蛍光の発光（これは、毎秒、蛍光担体のモルあたり、発光する光量子のモル数で測定される）は、蛍光担体の量の指標として（それゆえ、サンプル中のプローブの量の指標として）用いることが可能である。そうした測定のための適切な機械の使用は、Chromagen社によって開発されてきたものだが、以下の操作を含んでいる。すなわち、(i) $290\text{ nm} \leq \lambda \leq 320\text{ nm}$ の範囲で高い強度の励起を可能にする150ワットのHg/Xe CW 円筒型ランプ、(ii) 超高感受性フォトマルチプライアー（これに使用されているフォトダイノードは、発光の範囲が $360\text{ nm} \leq \lambda \leq 550\text{ nm}$ の間のみで反応するようコートされている）、(iii) 発光フィルターとして用いることが可能な、ガラス壁ではない水晶製励起窓を有する円筒型キュベット、である。このキュベットをマウントするのは、全サンプルをフォトマルチプライアーのチューブの前面に集めることを可能にするためである。そして(iv) 5台の、コンピューター制御された光量子計測クロック（これは順番に接続されており、いずれも毎秒 10^9 の頻度で光量子を識別できる）。

室温、及び $pH = 10$ の条件下で、モノマーのフォルマイシンAと、489個のフォルマイシン残基を含む完全長のXef-1 α プローブを用いた実験において、我々が見いだしたことは、(i)モノマーとプローブの連続希釈の発光は、濃度と直線的な関係があり、(ii)プローブの発光は、同じ数のフリーなモノマーと、等価である、ということである。図17と18に示したような、恒久的な蛍光担体を用いた代表的なアッセイにおいて、サンプル中に存在する標的の量は、結合しなかったプローブを洗い落とした後に、ハイブリッドを変性すること

によって、結合したプローブの量を測定することで、決定された。ここで用いた塩基性条件下において、モノマーの数と同じだけの発光量に対するアナログプローブ配列中の残基の蛍光の当量を示すものは、無視し得る自己消光がオリゴマー中にしかないので、ターゲットRNAやDNAによって結合したプローブの量の定量に、プローブの発光を直接に用いることができるということをも示している。それ故、幅広い用途での核酸アッセイや診断に用いる検出材料のデザインにあたって、広範囲にあたる原理を与えるものである。検出感度とシグナル／ノイズ比は、計測される光量子の数と計測されている間の時間周期数との相関であるという点が、本発明から得られた重要な結論である。

例10 オリゴヌクレオチドおよび複合体の固定のための、または"標識"としての蛍光オリゴマーの接続のための、5'および3'リンカーの接続

本発明の実験手順と化学原理は、蛍光ヌクレオシドアナログを用いるあらゆるプローブの合成と同定に用いることが可能である。その合成法が酵素を用いるものであろうと化学的なものであろうと、蛍光活性とハイブリダイゼーションの特異性の両方に関して適用できる。そうしたプローブは、ここに述べてきたような液体中でのハイブリダイゼーションの形態だけでなく、研究室などでより頻繁に用いられる技術にも用いることができる。その技術とは、"ドット・ブロット"検出法、アガロースまたはポリアクリルアミドゲル電気泳動、サザンブロッティング、フィルターやメンブレン上でのハイブリダイゼーションとHPLCやキャピラリー電気泳動法によるハイブリッドの分離などである。リンカーは液体ハイブリダイゼーションに必須ではないが、ビオチン／アビジンを利用したものや、

ホモ／ヘテロー二官能性リンカーなどのように、適当な親和性を持つリンカーは、PCRで増幅したDNA断片について図18に図示してあるように、プローブあるいはハイブリッドを、捕捉、濃縮、単離または検出するために用いることが可能である。本発明には、オリゴヌクレオチドと同様リンカーから派生した蛍光ヌクレオチド、蛍光オリゴヌクレオチドプローブによる増幅やそれに続く検出に用いられる、リンカーから派生したプライマー、そうしたオリゴヌクレオチドプローブ、プラスミド、ここに記述されているような応用例と使用方法をもとに開発さ

れた、もしくはそれから”標識”された治療薬などが含まれている。そうした派生例は以下の応用例も含むが、しかしこれらに限定されるものではない。すなわち、プリンまたはピリミジンヌクレオシド、もしくはそれらの蛍光構造を持つアナログへのアミノ基転移、アミノチオール (amino-thiol)、アジド (azido-)、アルデヒド (aldehyde)、ヒドロキシコハク酸イミド (hydroxysuccinimide)、5' アミノアルキル-3'-O-フォスフォルアミダイト (5' aminoalkyl-3'-O-phosphoramidite)、5'-チオアルキル-3'-O-フォスフォルアミダイト (5'-thioalkyl-3'-O-phosphoramidite)、3'-アミノヘキシルアミノ (3'-aminohexyl amino)、アミノシラン (amino silane)、アミノシリル派生物 (aminosilyl derivatives)、及び他のリンカーやリンカーと反応する物質群、または、3' か 5' が酸化されたシス-ジオールのシッフ塩基縮合のように、縮合反応中の物質群などである。これらは、技術に通じている者にはよく知られているものである。以上にあげたことを説明するために、特殊なケースを以下に示す。

(i) MOMP 遺伝子のシーケンスに対する非蛍光増幅プライマーのセットを、化学的に合成した。合成の最終段階で、もう1サイクル増やして、5'-アミノヘキシル-3'-O-フォスフォルアミダイトを、通常のフォスフォトリエステルの化学を用い化学的に合成して完成させたプライマーの5' 末端に付加した。

(ii) 強力なエトキシドで固相担体から外した後、それぞれの鎖の末端ア

ミノ群をNHS-ビオチンエステルと反応させて、5' ビオチン化プライマーを合成した。

(iii) プライマーを通常の方法で増幅に用いた。その後、アンプリマーをアビジン化した96穴フィルタープレートで捕獲し、未反応の原料と不純物を除去するために洗った。

(iv) 上述したように、捕獲したアンプリマーを、蛍光アナログでラベルしたオリゴヌクレオチドプローブでハイブリダイズして、アンプリマー中のターゲットシーケンスの量を定量した。

本発明に含まれているのは、固定ビーズ、フィルター、活性化プラスチックプレート上で、蛍光アナログを他の蛍光または非蛍光オリゴヌクレオチドに結合させることである。その結合には、ライゲーションのように酵素的に結合させるもの、ここに記述されているようにリンカーを用いて化学的に結合させるものを含む。

例11 蛍光ヌクレオシドアナログおよびプローブの使用を拡大し促進するための蛍光共鳴エネルギー伝達(FRET)の利用

ここに記述したように、オリゴヌクレオチドを合成もしくは誘導体化させることができた。これは、二つあるいはそれ以上のスペクトル、検出可能なラベル、他と分離してはっきりした蛍光発光特性を伴う2つかそれ以上のヌクレオシドアナログを用いるか、または上記にあるように共有結合したFRETアクセプターを用いるか、いずれかの方法によって明らかになったものである。もし、FRETアクセプターが、プローブ発光のアクセプターとして溶液中で簡単に扱えるのならば、それらもまた、蛍光プローブの検出の感度を上げるか、検出範囲を広げるために用いることができる。実例を挙げるならば、クマリンのような染料、例えば7-アミノ-4-メチルクマリン-3-アセテート(7-amino-4-methylcoumarin-3-acetate)、7-メチルーウンベリフェロン(7-methyl-umbelliferone)、ナフタレン(naphthalene)及びアントラセン染料(anthracene dyes)などの励起スペクトラムは、蛍光ヌクレオシドアナログ、例えばポリ(FU)から合成したオリゴマーの発光スペクトラムと重複している。ただし、オリゴマー自身の

励起スペクトラムとは重複していない。7-アミノ-4-メチルクマリナー3-アセテートのような染料は、そうした理由により、(i) 実例としては、N-ヒドロキシコハク酸イミドエステル (N-hydroxysuccinimide ester) とオリゴマー上のアミノ基群とを反応させたときのように、共有結合したFRETアクセプターとして用いるか、または(ii) プローブ蛍光のFRETインジケーターとして用いるために、プローブ溶液に単なる染料として加えるか、いずれかの利用の仕方がある。ハイブリダイゼーションプローブへの2つめの蛍光ラベルを与えるという明らかな利点に加えて、この方法論はプローブシグナルの増幅にも役立つ。それは、発光のより効率的な捕獲、励起源からの拡散光を主とするバックグラウンドの低減、そしてより長い可視波長の検出などによって実現する。

例12 RNaseH増幅法

はじめに、RNA蛍光プローブをDNAサンプルと接触させる。RNA蛍光プローブは、標的DNA配列にハイブリダイズする。RNaseHは、RNA:DNAハイブリッドのみを切断し、1本鎖RNAプローブは切断しない。その結果生じた蛍光モノマーは、溶液中に放出されるので、次のRNAプローブが、切断されるべくハイブリダイズすることができる。実験の最終段階では、モノマーを通常のメンブレン上で分離し、放出されたモノマーの量を、簡単なフルオロメトリーで測定する。ハイブリッドをDNAなしで行った標品は、蛍光を全く生じなかった。

ここに記述した実験例と具体例は、ただ説明する目的のためだけのものであり、それに照らしてみた場合の各種修正や変更は、当業者に示唆されているものであることは理解されるべきである。それらは、出願の思想と範囲および添付された請求の範囲の権利範囲の中に包含されるべきものである。

： 配列番号：1

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：39塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：ゲノムDNA

(iii) ハイボゼティカル：NO

(iv) アンチセンス：NO

(vi) 起源：

(A) 生物名：Chlamydia trachomatis

(C) 個体・単離クローン名：L2/434/Bu

(G) 細胞の種類：Bacterium

(vii) 直接の起源：

(A) ライブラリー：lambda 1059 recombinant

(B) クローン：lambda gt11/L2/33

(viii) ゲノム内での位置：

(A) 染色体/セグメント名：omp112 ORF

(xi) 配列：配列番号1

AACGTTTCGAG ACGGACACCC CTTAGGACGA CTGGGTTTCG

39

配列番号：2

(i) 配列の特徴：

(A) 配列の長さ：39塩基

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(ii) 配列の種類：転写されたDNA又はRNA

(iii) ハイボゼティカル：NO

(iv) アンチセンス：YES

(ix) 配列の特徴：

(A) 名称/キー：相補的プローブ

(C) 特徴を決定した方法：Hybridization to SEQ ID NO.1

(D) 他の情報：Control for SEQ ID NO.3

(xi) 配列：配列番号2

TTGCAAGCTC TGCCTGTGGG GAATCCTGCT GAACCAAGC

39

配列番号: 3

(i) 配列の特徴:

(A) 配列の長さ: 39塩基

(B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(ii) 配列の種類: 転写されたDNA又はRNA

(iii) ハイボゼティカル: NO

(iv) アンチセンス: YES

(ix) 配列の特徴:

(A) 名称/キー: 類似した相補的プローブ

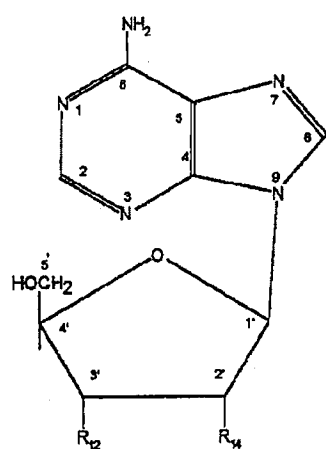
(C) 特徴を決定した方法: Hybridization to SEQ ID NO.1

(D) 他の情報: Analog to SEQ ID NO.2

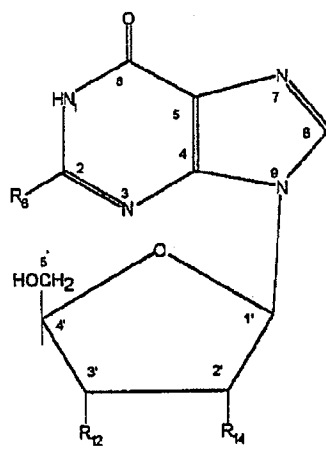
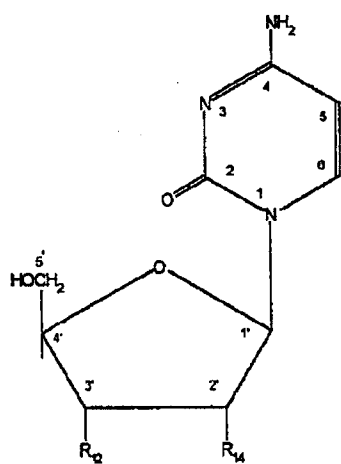
(xi) 配列: 配列番号3

TTGCNNGCTC TGCCTGTGGG GNNTCCTGCT GNNCCNNGC

【 図 1 】



Adenosine

Guanosine or
Inosine

Cytidine

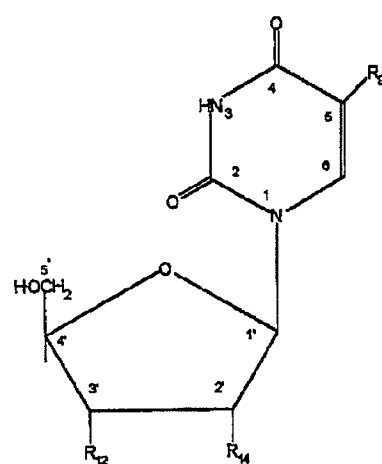
Thymidine
or Uridine

Figure 1

【 図 2 】

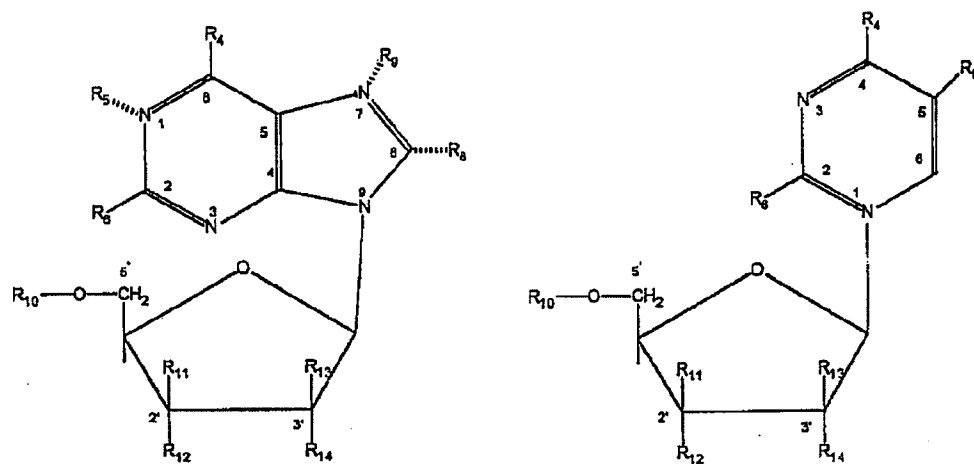


Figure 2

【 図 3 】

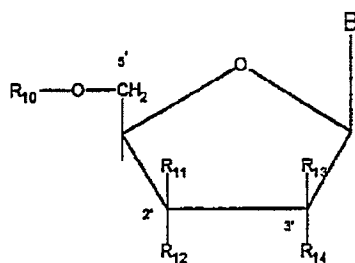


Figure 3

【 图 4 】

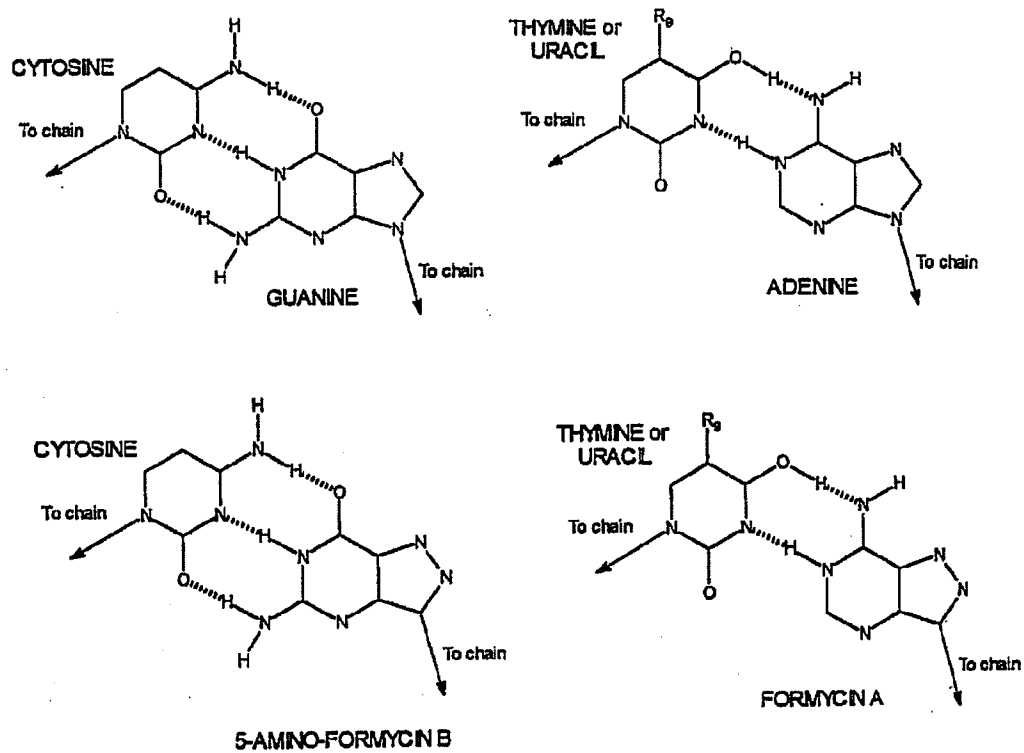
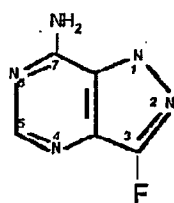
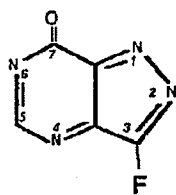


Figure 4

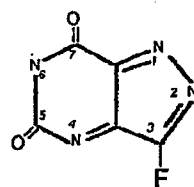
【 图 5 】



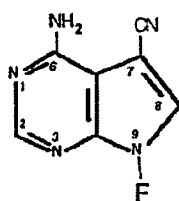
FORMYCIN A



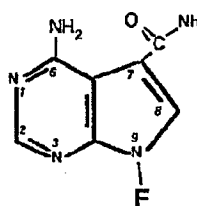
FORMYCIN B



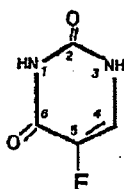
OXOFORMYCIN B



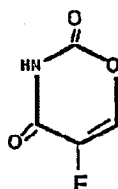
TOYOCAMYCIN



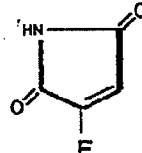
SANGIVAMYCIN



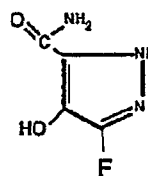
PSEUDOURIDINE



MINIMYCIN



SHOWDOMYCIN



PYRAZOMYCIN

Figure 5

【 図 6 】

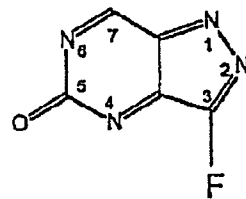
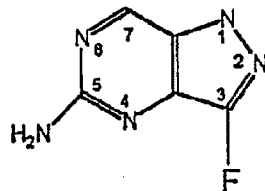
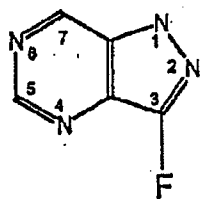
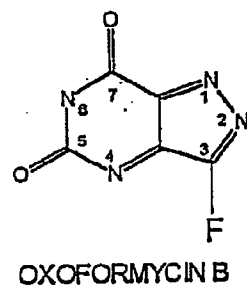
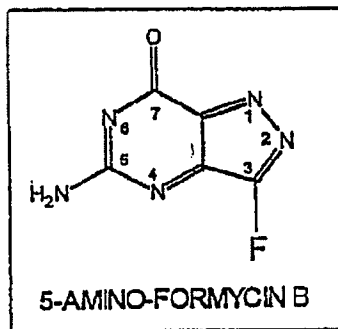
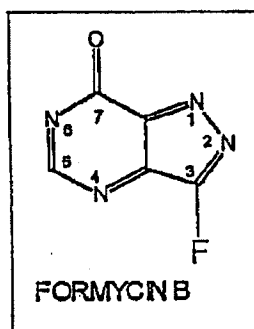
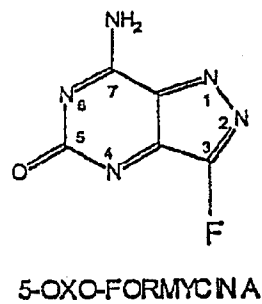
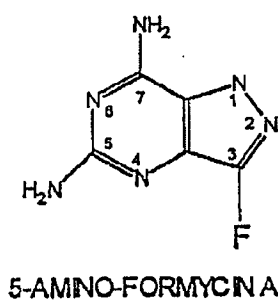
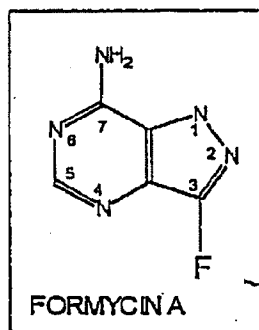
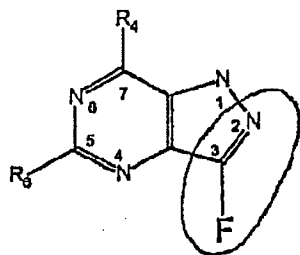


Figure 6

【 図 7 】

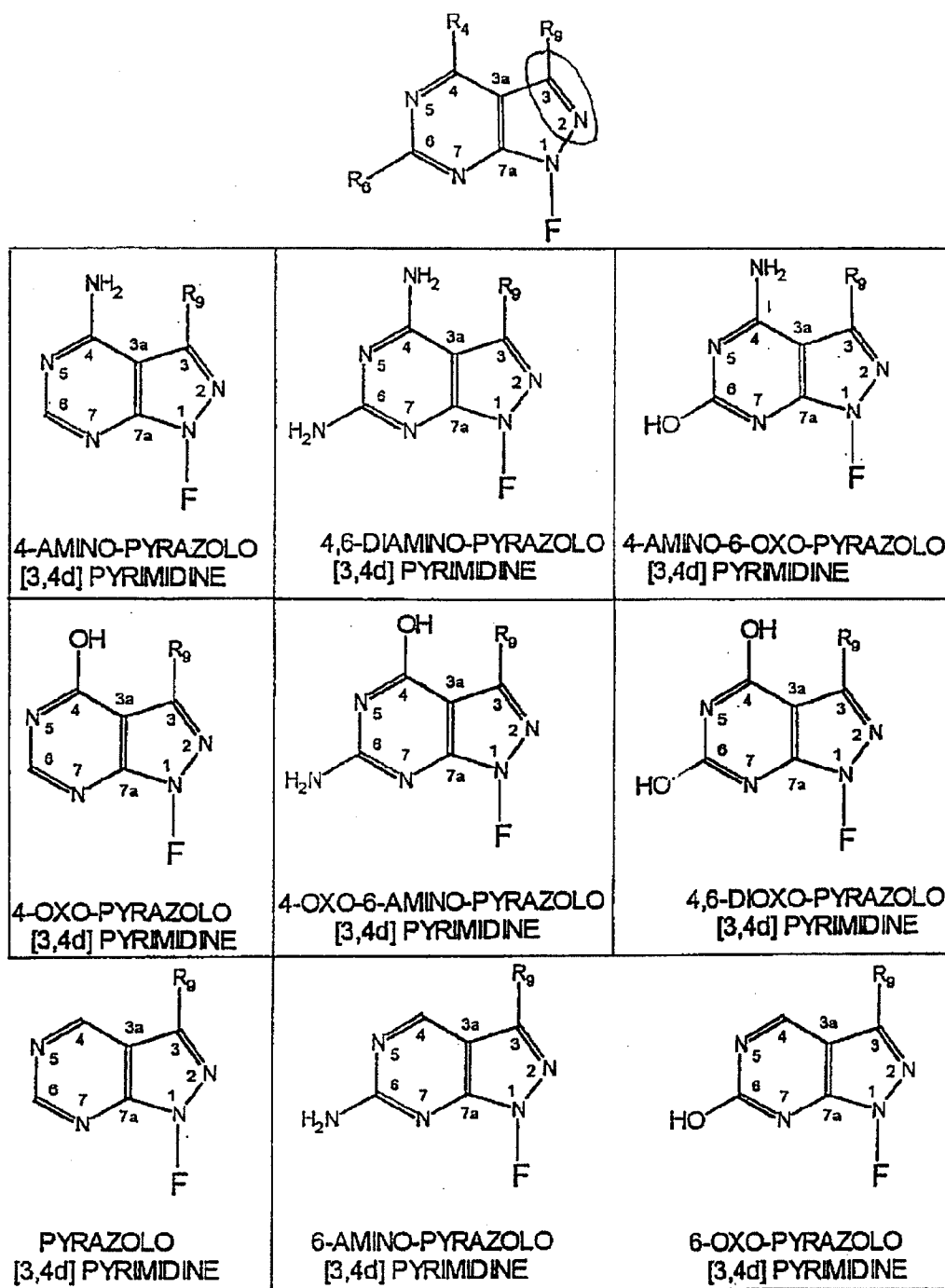


Figure 7

【 图 8 】

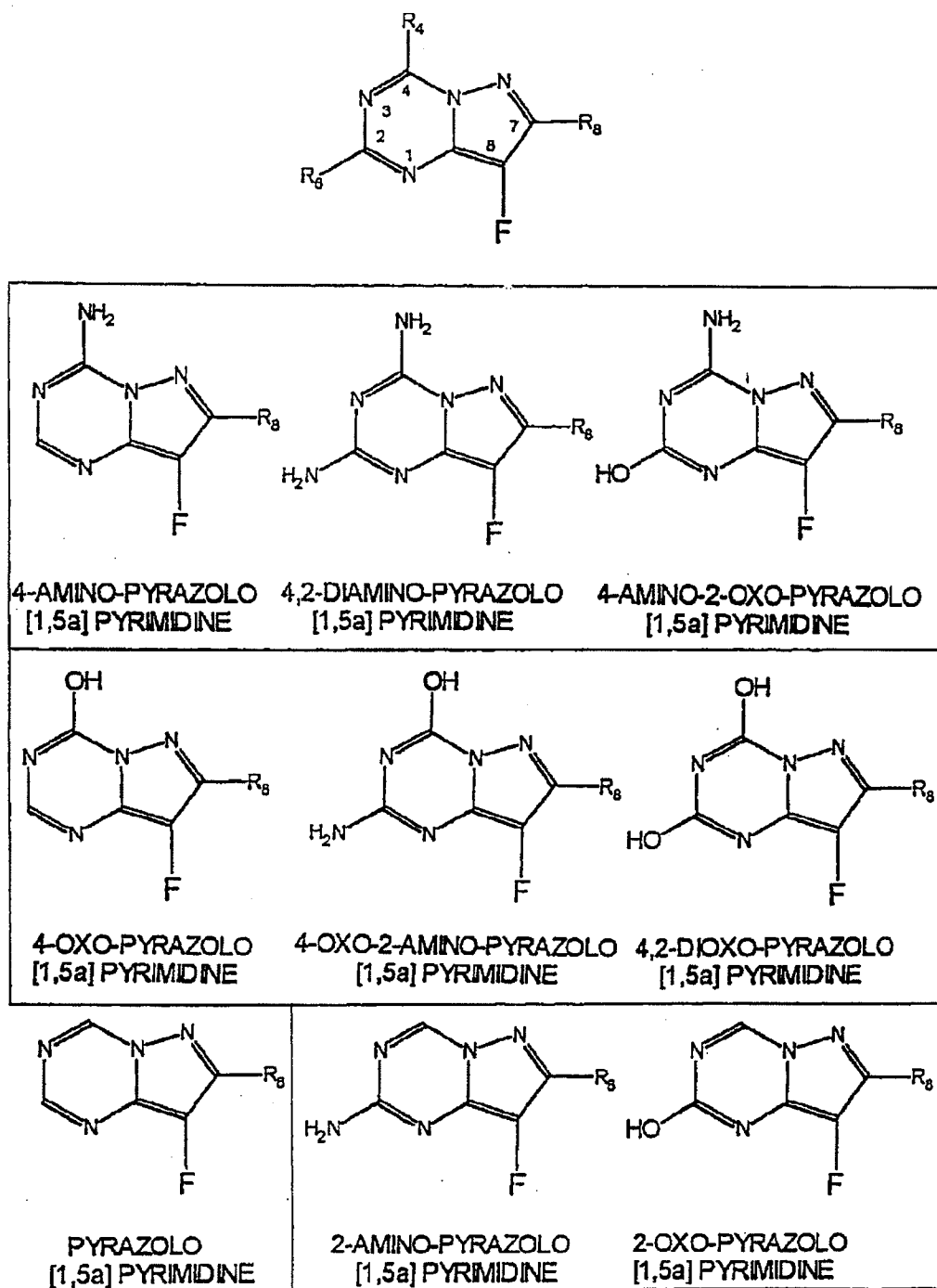


Figure 8

【 图 9 】

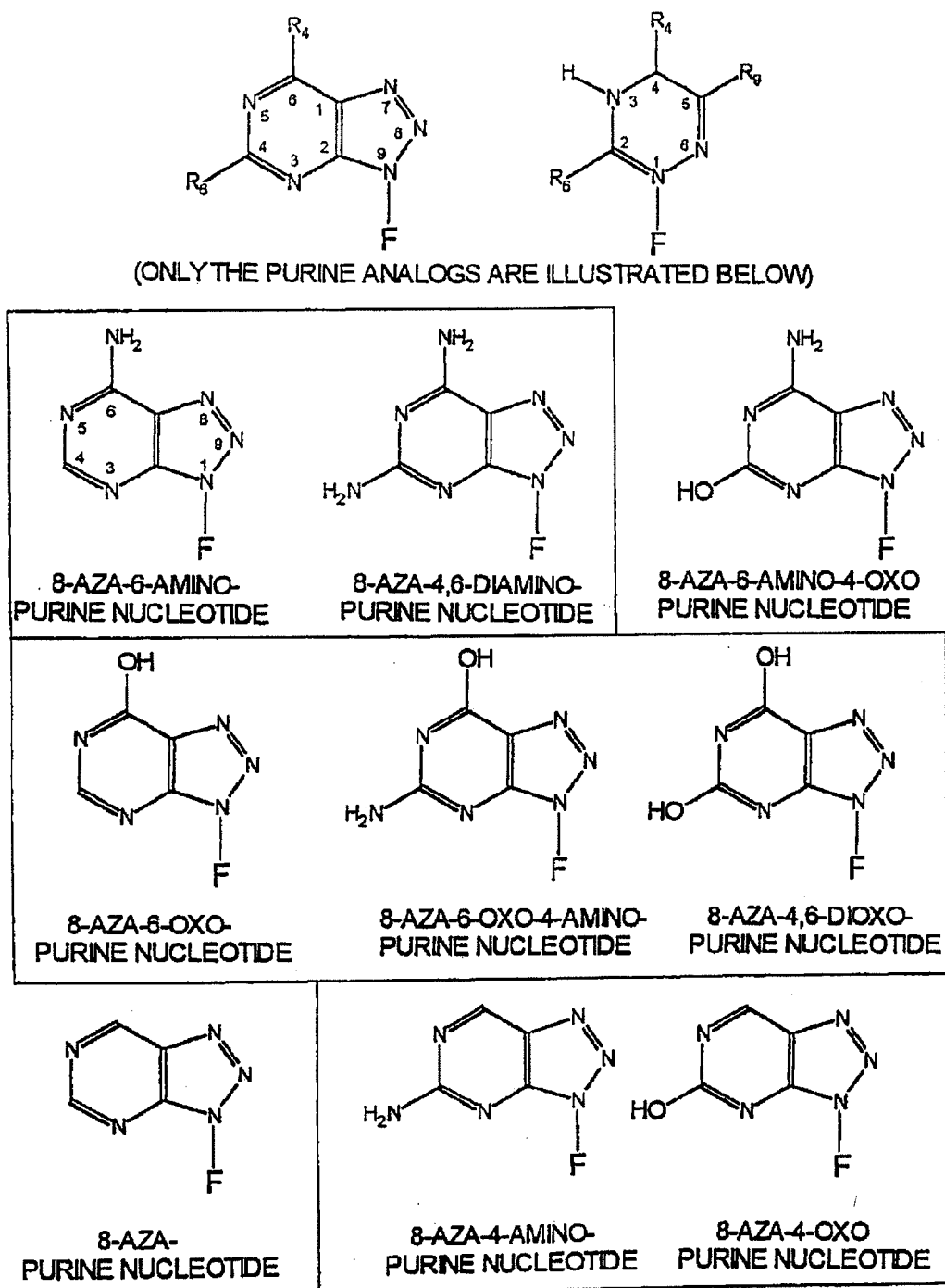
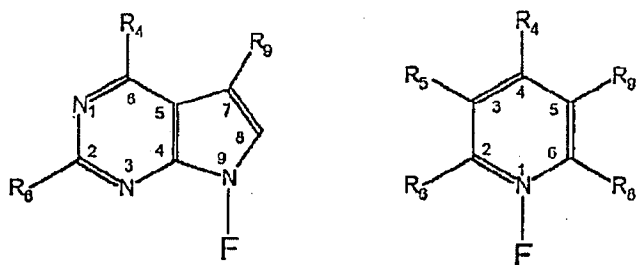


Figure 9

【图10】



(ONLY THE PURINE ANALOGS ARE ILLUSTRATED BELOW)

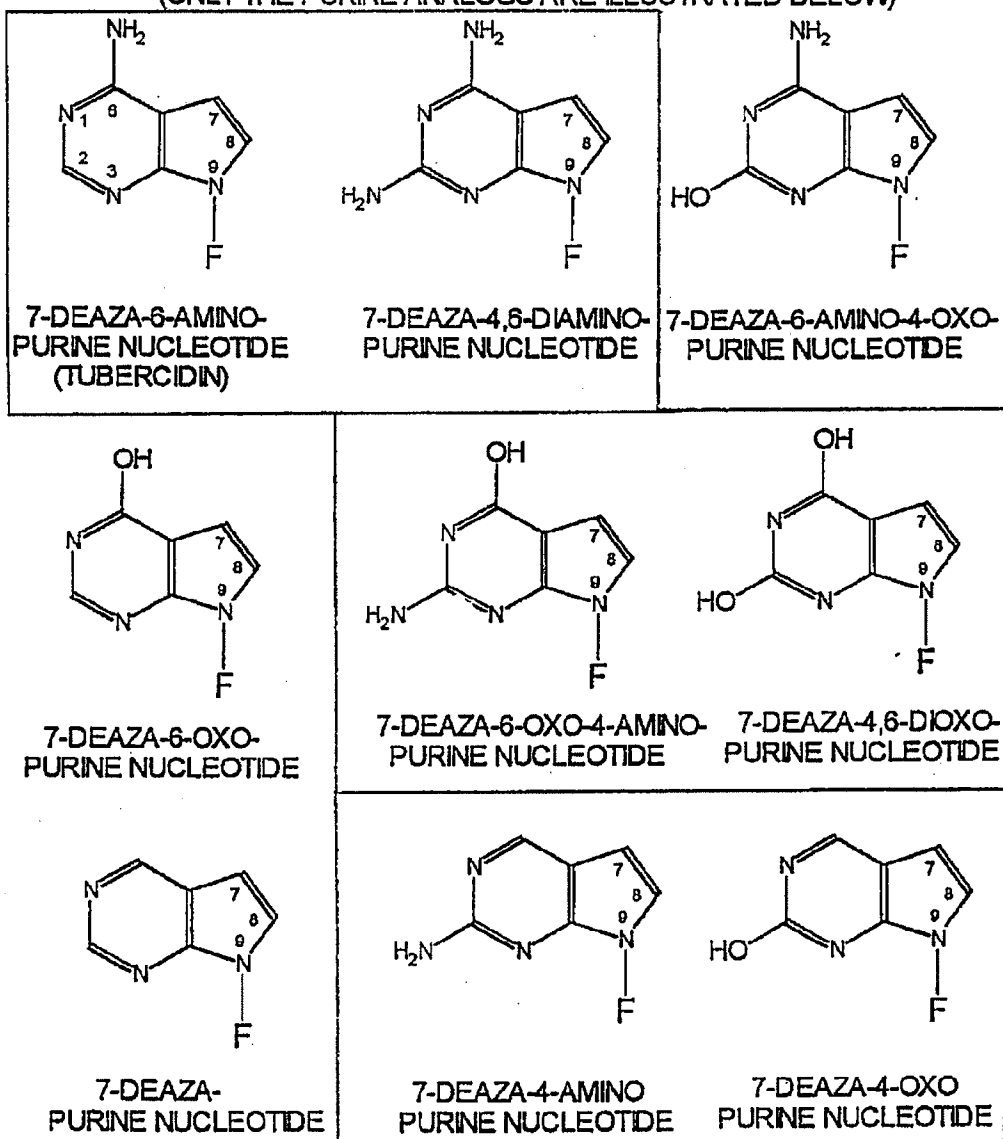
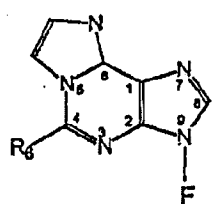
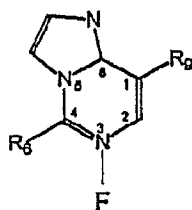


Figure 10

【 図 1 1 】

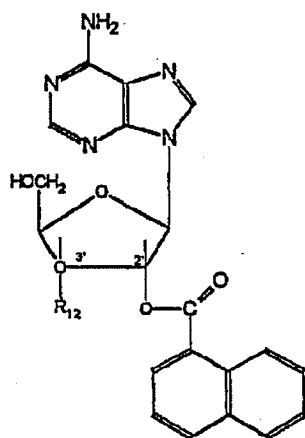


1,N₉ ETHENO
PURINE NUCLEOTIDES

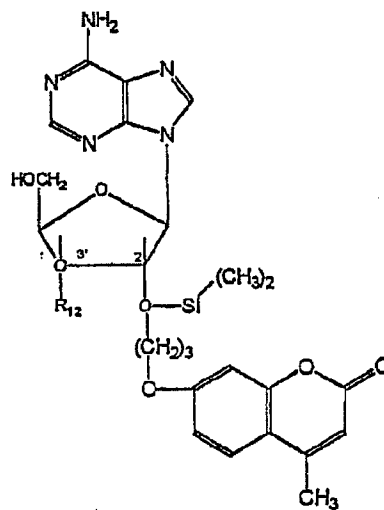


1,N₉ ETHENO
PYRIMIDINE NUCLEOTIDES

Figure 11A



2'-O-(1)-NAPHTHOYL
Adenosine



2'-O-DIMETHYLSILYL-PROPOXY-
4-METHYL COUMARYL Adenosine

Figure 11B

【図12】

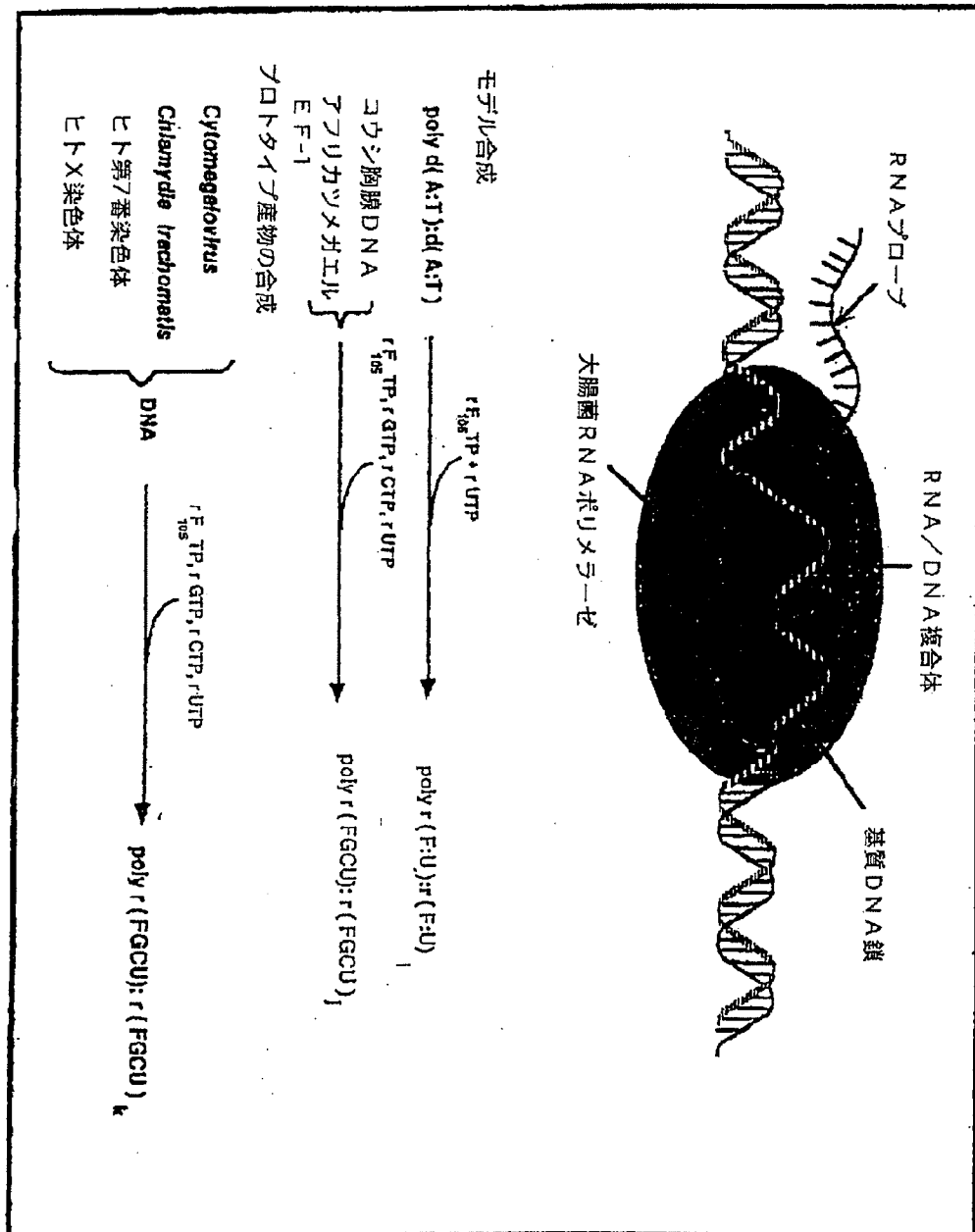


FIGURE 12

【図13】

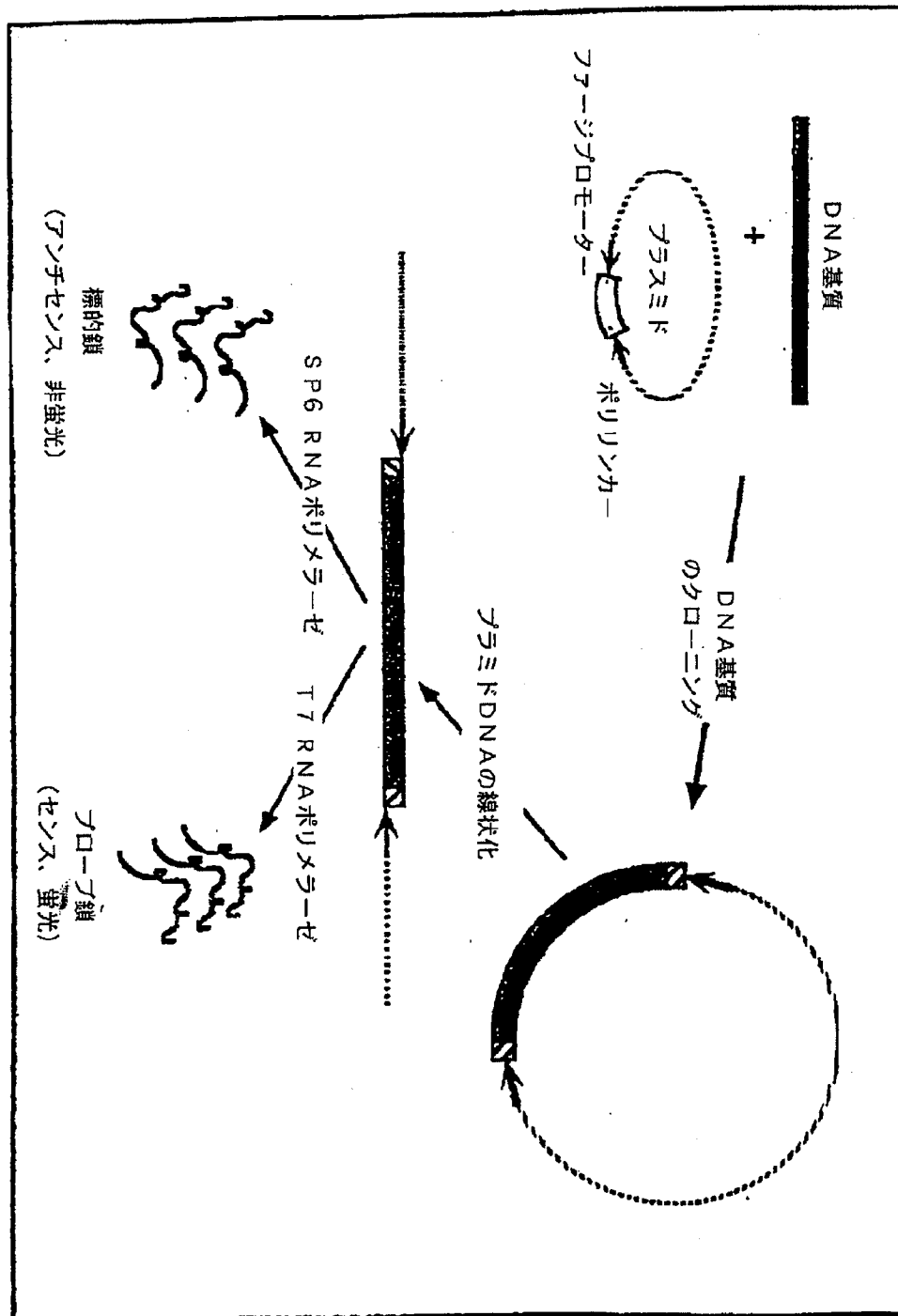
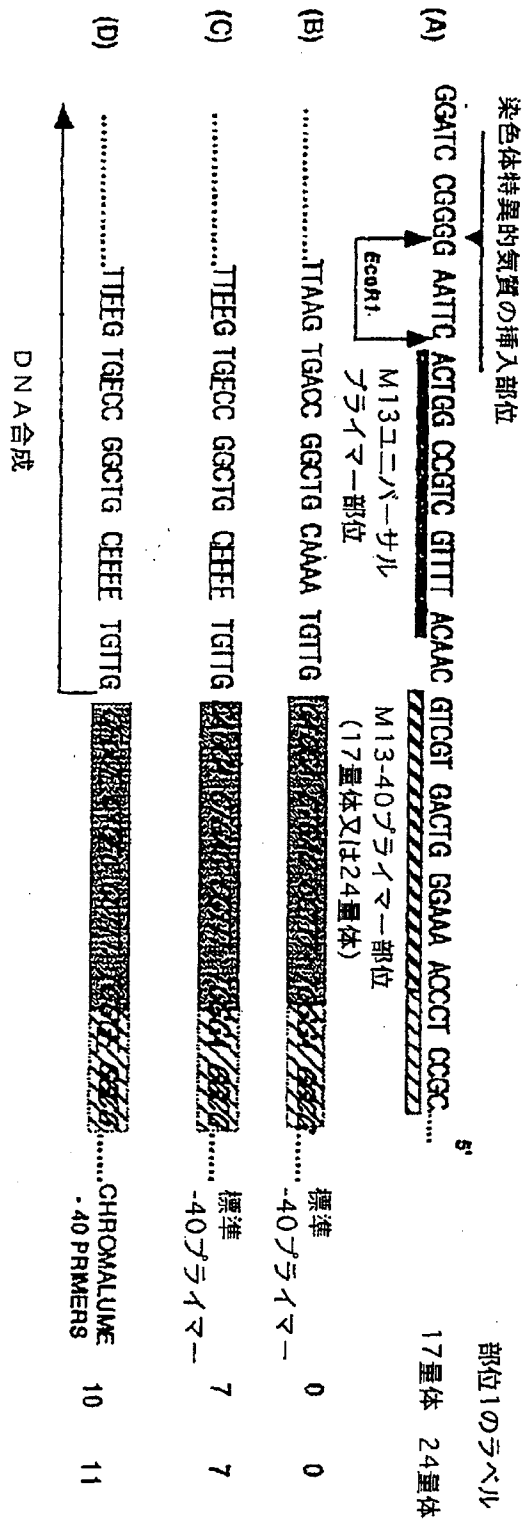


FIGURE 13



17 量体 プライマーを用いた場合は新規な配列データは42番目の残基から始まる
24 量体 プライマーを用いた場合は新規な配列データは49番目の残基から始まる

FIGURE 14

【図15】

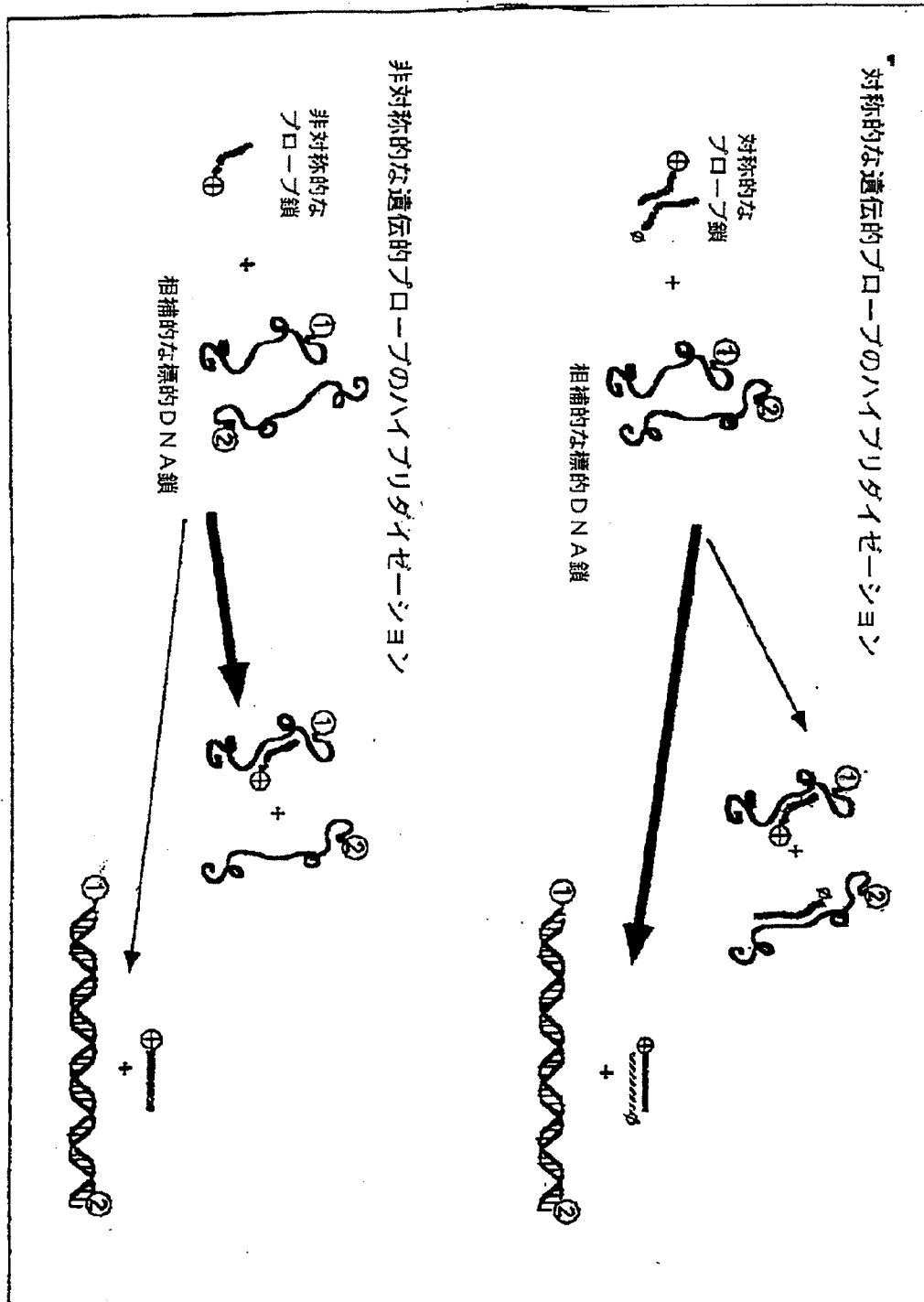


FIGURE 15

【図16】

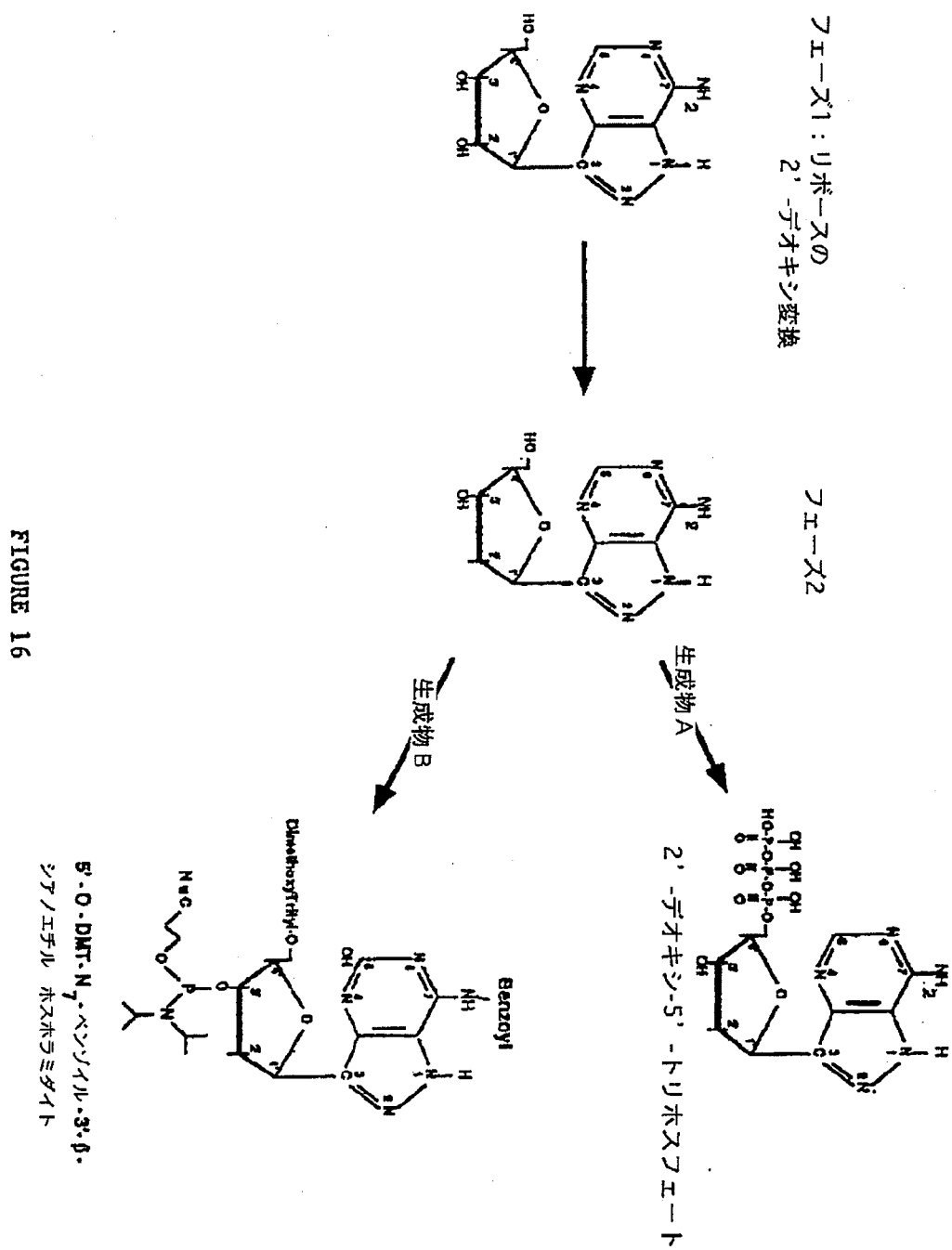


FIGURE 16

【図17】

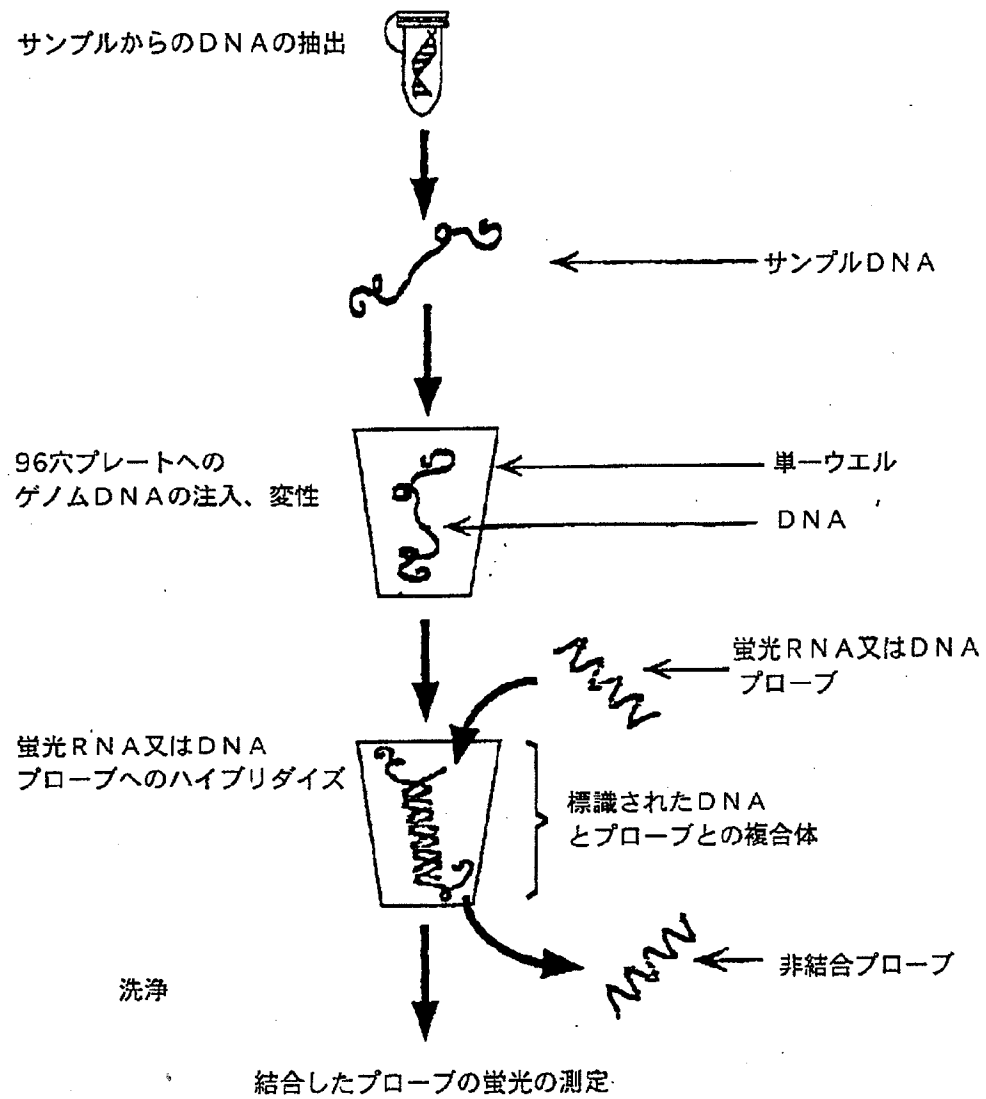


FIGURE 17

【図18】

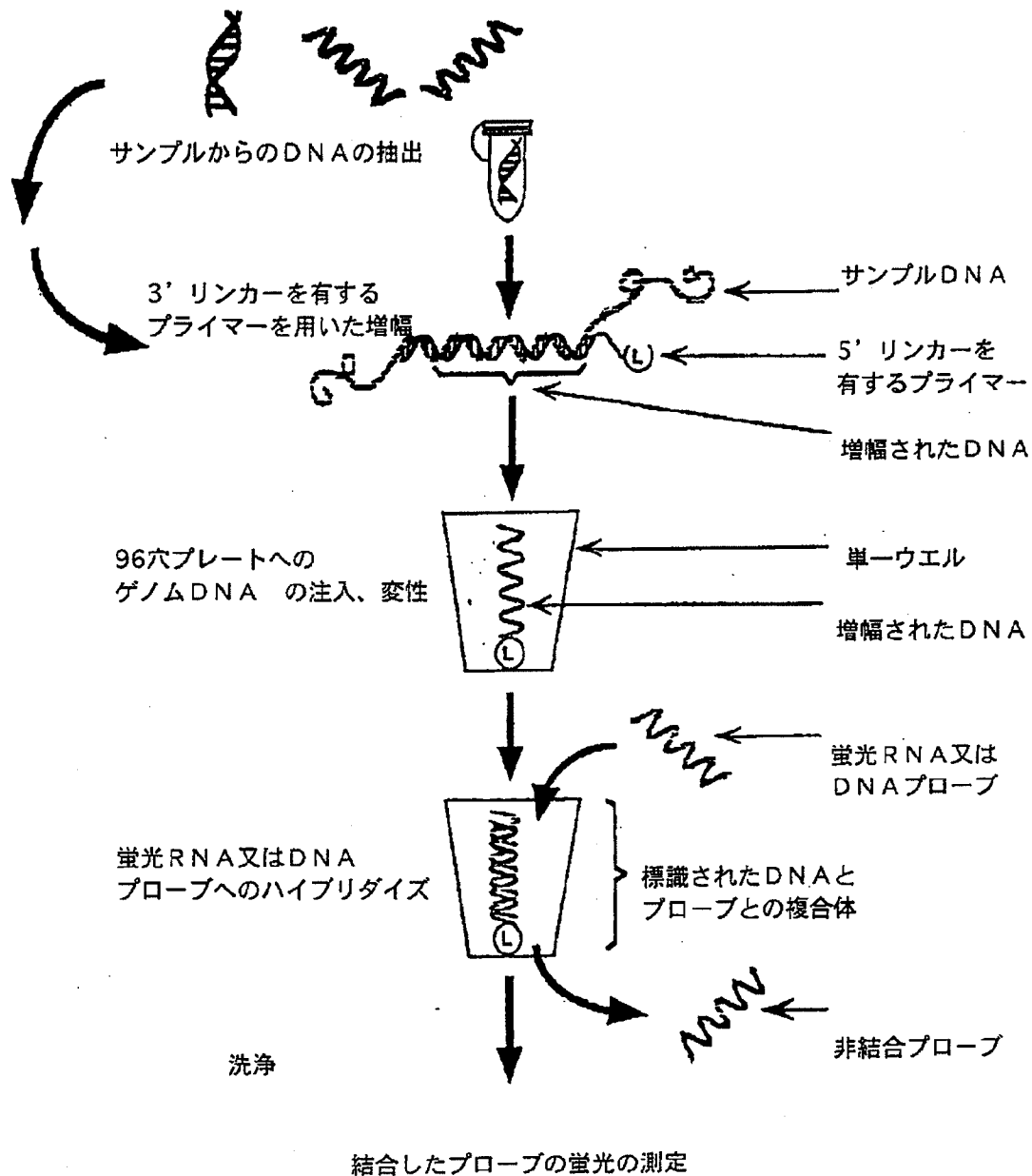


FIGURE 18

【図19】

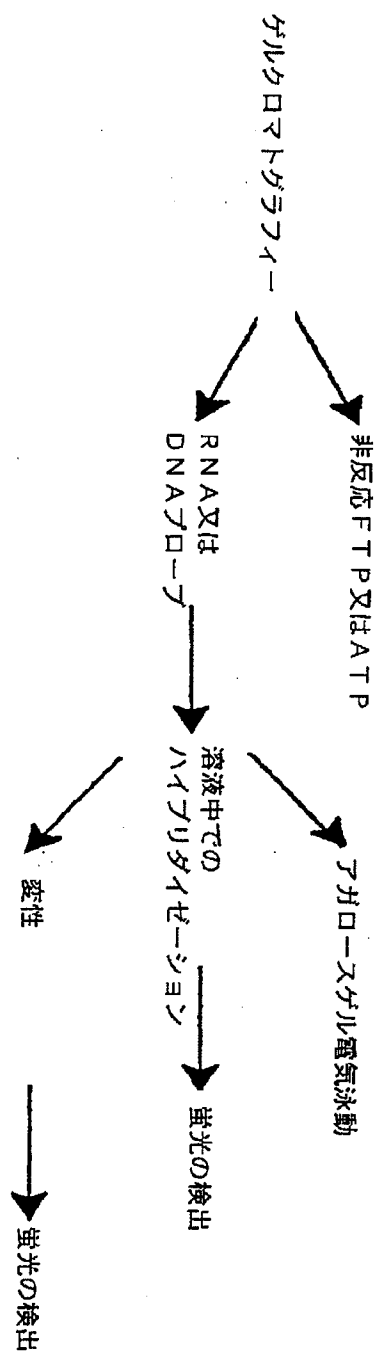


FIGURE 19

【图 20】

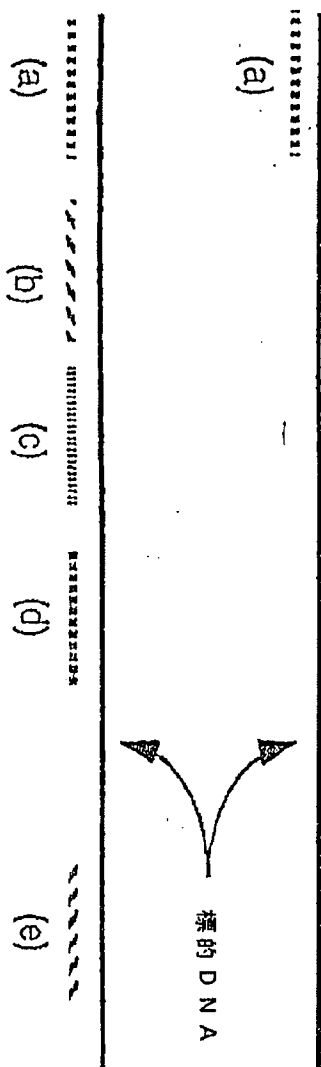


Figure 20

【 2 1 】

	A CLASS	B GENERAL STRUCTURE	C BASE NAME	D	E ABSORBANCE		F
					abs max ?	e ?	
1							
2				>280nm ?			
3							
4	N-Nucleoside	Purines	1-methyl adenine	NO			
5			2-methyl adenine	NO			
6			3-methyl adenine	NO			
7			6-methyl adenine	NO			
8			6,6-Dimethyl adenine	YES			
9			2,6-Dimethyl adenine	YES			
10			2,2-Dimethyl adenine	YES			
11			2-aminopurine	YES	303 nm	>9500	
12			2,6-Diaminopurine	YES	304 nm	>9500	
13			6-hydroxyethyl adenine				
14			2,8-Dihydroxy adenine				
15			8-amino adenine				
16							
17			1-methyl guanine				
18			2-methyl guanine				
19			7-methyl guanine	YES			
20			8-amino guanine	YES			
21			8-thio guanine	YES			
22			2,2-Dimethyl guanine	YES			
23			2-methylamino guanine				
24							
25			7-methyl hypoxanthine	YES			

Figure 21A

【 2 1 】

	G	H	I	J	K	L
1	EMISSION at 25°C				SYNTHESIS	CODE
2	yes/no ?	solvent	pH ?	F	CGN/PBO	
3						
4	NO				/PBO	F45
5	NO				/PBO	F47
6	NO				/PBO	F48
7	NO				CGN/PBO	F49
8	YES				/PBO	F52
9	YES				/PBO	F54
10	YES				/PBO	F56
11	370 nm	H2O	7	0.7	CGN/PBO	F57
12	350 nm	H2O	7	0.01	/PBO	F58
13						
14						
15						
16						
17	NO				/PBO	F60
18					/PBO	F62
19	YES				CGN/PBO	F63
20					/PBO	F64
21					/PBO	F65
22	YES				/PBO	F67
23						
24						
25	YES				CGN/PBO	F74

Figure 21A-1

【 2 1 】

	A CLASS	B GENERAL STRUCTURE	C BASE NAME	D	E ABSORBANCE		F
					abs max ?	e ?	
1							
2		STRUCTURE		>280nm ?			
3							
26			Nebularine	YES	315 nm		
27			2-hydroxy-6-thioguanine	YES			
28			2-thiopurine	YES	315 nm	> 20,000	
29			6-mercaptopurine	YES			
30			2-amino-6-mercaptopurine	YES	340 nm	> 20,000	
31			2-hydroxy-6-mercaptopurine	YES			
32							
33		Pyrazolo-[3,4- pyrimidines	4-amino-pyrazolo[3,4d]pyrim. 1-methyl-A[3,4]PP	YES	300 nm		
34			1-methyl-A[3,4]PP	YES	290 nm		
35			4-methyl-A[3,4]PP	YES	305 nm		
36			7-methyl-A[3,4]PP	YES	260 - 320 nm		
37							
38			2-methyl-A[3,4]PP	YES	300 nm		
39			6-methyl-A[3,4]PP	YES	260-320 nm		
40			2,6-Dimethyl-A[3,4]PP				
41			2,4-Dimethyl-A[3,4]PP				
42			1,4-Dimethyl-A[3,4]PP				
43			4-Mercapto-A[3,4]PP				
44			4-Methylthio-A[3,4]PP				
45			4-Benzylamino-A[3,4]PP				
46			4,4-Dimethylamino-A[3,4]PP				
47			4-Hydrazino-A[3,4]PP				

Figure 21B

【 2 1 】

	G	H	I	J	K	L
1	EMISSION at 25°C				SYNTHESIS	CODE
2	yes/no ?	solvent	pH ?	F	CGN/PBO	
3						
26	YES				CGN/PBO	F77
27					/PBO	
28					/PBO	
29					/PBO	
30					/PBO	
31					/PBO	
32						
33	430 nm	H2O	3	0.06	CGN/PBO	A[3,4]PP
34	365 nm	H2O	3	0.02		F141
35	460 nm	H2O	7	0.08	CGN/PBO	F144
36	430 nm	H2O	11	0.16	CGN/PBO	F143
37	430 nm	H2O	3	0.09	CGN/PBO	
38	360 nm	H2O	3	0.08	CGN/PBO	F148
39	YES	H2O	11		CGN/PBO	F145
40						
41						
42						
43					CGN/PBO	F146
44						
45						
46					CGN/PBO	F147
47						

Figure 21B-1

【 2 1 】

	A CLASS	B GENERAL STRUCTURE	C BASE NAME	D	E ABSORBANCE		F
					abs max ?	e ?	
1							
2		STRUCTURE		>280nm ?			
3							
48			4-Hydroxamino-A[3,4]PP				
49			4-Methylamino-A[3,4]PP				
50			4-Methoxy-A[3,4]PP				
51			4-p-nitrobenzylthio-A[3,4]PP				
52			4-amino-3-formidate-A[3,4]PP				
53			4-amino-3-thiocarbamate-A[3,4]PP				
54			4-amino-3-cyano-A[3,4]PP				
55			4-amino-3-carboxamide-A[3,4]PP				
56			4-amino-3-carboxyl-A[3,4]PP				
57			3-amino-4-hydroxycarboxamide-4-A[3,4]PP				
58			4-amino-3-methyl-A[3,4]PP				
59							
60							
61		Pyrrolo-[2,3d]	4-amino-pyrrolo[2,3d]pyrim.	YES			
62		pyrimidines	5-methyl-A[2,3]PP	YES			
63			5-cyano-A[2,3]PP	YES			
64			5-amino-A[2,3]PP	YES			
65			6-cyano-A[2,3]PP	YES			
66			6-amino-A[2,3]PP	YES			
67			5-carbamoyl-A[2,3]PP	YES			
68			5-carbamoyl-A[2,3]PP	YES			
69			6-methyl-A[2,3]PP	YES			

Figure 21C

【 2 1 】

	G	H	I	J	K	L
1	EMISSION at 25°C				SYNTHESIS	CODE
2	yes/no ?	solvent	pH ?	F	CGN/PBO	
3						
48					CGN/PBO	F148
49					CGN/PBO	F149
50						
51						
52					CGN/PBO	F150
53					CGN/PBO	F151
54					CGN/PBO	
55					CGN/PBO	
56					CGN/PBO	
57					CGN/PBO	
58						
59						
60						
61	YES	H2O	7		CGN/PBO	A[2,3]PP
62						
63						
64						
65						
66						
67						
68						
69					CGN/PBO	

Figure 21C-1

【 2 1 】

	A	B	C	D	E	F
1	CLASS	GENERAL	BASE NAME		ABSORBANCE	
2		STRUCTURE		>280nm ?	abs max ?	e ?
3						
70			7-deazaguanine	YES		
71						
72						
73		Azanucleotide	8-azaadenine			
74			8-aza-2,6-Diaminopurine			
75			2-amino-8-azaguanine			
76			8-azaguanine			
77			8-azahypoxanthine			
78						
79						
80		Deaza-	3-Deazaadenine			
81		nucleotides	8-amino-3-deazaadenine			
82			8-methyl-3-deazaadenine			
83			7-Deazanebularine			
84						
85	C-Nucleoside					
86		Pyrazolo-[4,3]	7-amino-	YES	293 nm	
87		pyrimidines			303 nm	
88					303 nm	
89					303 nm	
90					303 nm	
91						

Figure 21D

【 2 1 】

	G	H	I	J	K	L
1	EMISSION at 25°C				SYNTHESIS	CODE
2	yes/no ?	solvent	pH ?	F	CGN/PBO	
3						
70	YES	H2O	7		/PBO	
71						
72						
73	YES				/PBO	
74						
75						
76	YES				/PBO	
77						
78						
79						
80						
81						
82						
83	400 nm	H2O	7		/PBO	
84						
85						
86	348 nm	H2O	7	0.06	/PBO	F105
87	405 nm	H2O	11	0.07	/PBO	
88	405 nm	EtOH	11	0.12	/PBO	
89	405 nm	PropGlycol	11	0.23	/PBO	
90	405 nm	DMF	11	0.24	/PBO	
91						

Figure 21D-1

【 2 1 】

	A CLASS	B GENERAL STRUCTURE	C BASE NAME	D	E ABSORBANCE		F
					abs max ?	e ?	
1							
2		STRUCTURE		>280nm ?			
3							
92			1-methyl-F105	YES	>300 nm		
93			2-methyl-F105	YES	>300 nm		
94			4-methyl-F105	YES	>300 nm		
95			5-amino-Pyrazollo-[4,3d] pyrim	YES	>300 nm		
96			2,5-anhydro-F105	YES	>300 nm		
97			7-methyl-F105	YES	>300 nm		
98			6-methyl-F105	YES	>300 nm		
99			4,2-Dimethyl-F105	YES	>300 nm		
100			7-methylamino-2-methyl-F105	YES	>300 nm		
101							
102			7-keto-	YES	>300 nm		
103				YES	>300 nm		
104					>300 nm		
105					>300 nm		
106					>300 nm		
107			1-methyl-F132	YES			
108			2-methyl-F132	YES			
109			4-methyl-F132	YES			
110			6-methyl-F132	YES			
111			7-methyl-F132	YES			
112			7-thio-F132				
113			7-methyl-1-ethyl-pyrazollo[4,3d]pyrim.				

Figure 21E

【 2 1 】

	G	H	I	J	K	L
1	EMISSION at 25°C				SYNTHESIS	CODE
2	yes/no ?	solvent	pH ?	F	CGN/PBO	
3						
92	355 nm	H2O	11	0.09	CGN/PBO	F164
93	360 nm	H2O	11	0.085	CGN/PBO	F165
94	445 nm	H2O	11	.09 - 0.1	CGN/PBO	F172
95	YES	H2O	11	0.6	/PBO	F142
96	YES	H2O	11		/PBO	
97	YES	H2O	11		CGN/PBO	F125
98	440 nm	H2O	11	0.002	CGN/PBO	F120
99	YES	H2O	11		CGN/PBO	
100	YES	H2O	11		/PBO	
101						
102	348 nm	H2O	7		CGN/PBO	F132
103	410 nm	H2O	11		CGN/PBO	
104	410 nm	ETOH	11		CGN/PBO	
105	410 nm	PropGlycol	11		CGN/PBO	
106	410 nm	DMF	11		CGN/PBO	
107					CGN	F133
108					CGN	F134
109					CGN	F135
110					CGN	F136
111					CGN	F137
112					CGN	
113					CGN	

Figure 21E-1

【 2 1 】

1	A CLASS	B GENERAL STRUCTURE	C BASE NAME	D	E ABSORBANCE		F
					abs max ?	e ?	
2				>280nm ?			
3							
114			7-Dimethyl-1-ethyl-pyrazollo[4,3d]pyrim.				
115			4,2-Dimethoxy-pyrazollo[4,3d]pyrim				
116			Oxoformycin B	YES			
117			1-methyl-Oxoformycin B	YES			
118			2-methyl-Oxoformycin B	YES			
119							
120			Pyrazollo-[1,5a]				
121			1,3,5-triazines 4-aminopyrazollo[1,5]-triazine	YES			
122			4-ThioAPT	YES			
123			4-methylthioAPT	YES			
124			4-Hydroxy-APT	YES			
125			4-Oxo-3H-PTR	YES			
126							
127							
128							
129							

Figure 21F

【 2 1 】

	G	H	I	J	K	L
1	EMISSION at 25°C				SYNTHESIS	CODE
2	yes/no ?	solvent	pH ?	F	CGN/PBO	
3						
114					CGN	
115					CGN	
116					/PBO	
117					/PBO	
118					/PBO	
119						
120						
121					/PBO	APTR
122					/PBO	
123					/PBO	
124					/PBO	
125					/PBO	OPTR
126						
127						
128						
129						

Figure 21F-1

【図22】

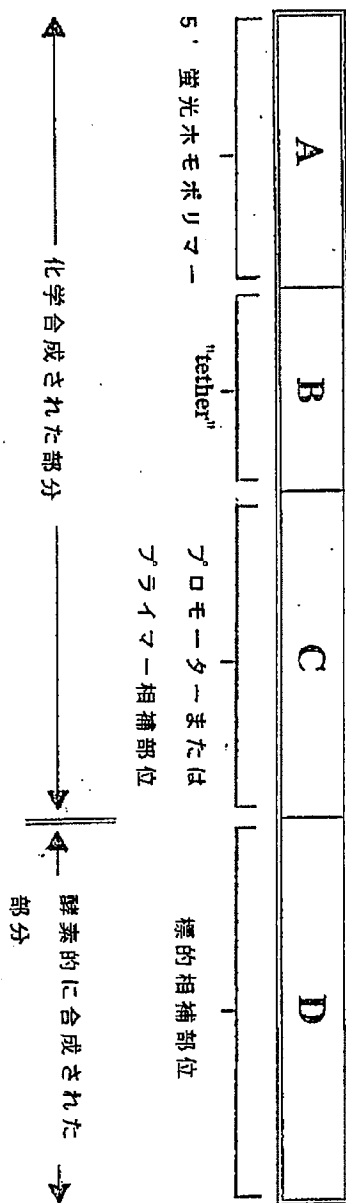


Figure 22

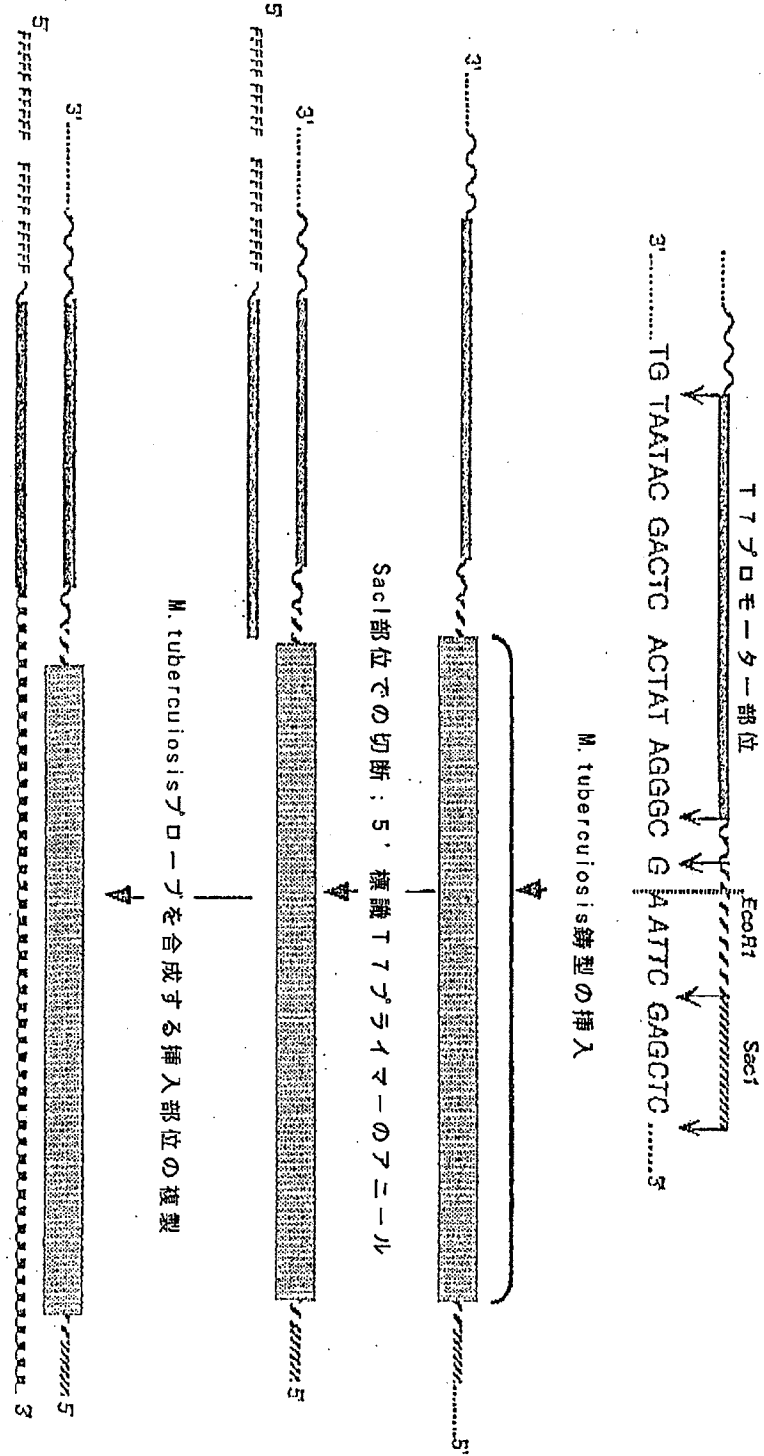


Figure 23

【图24】

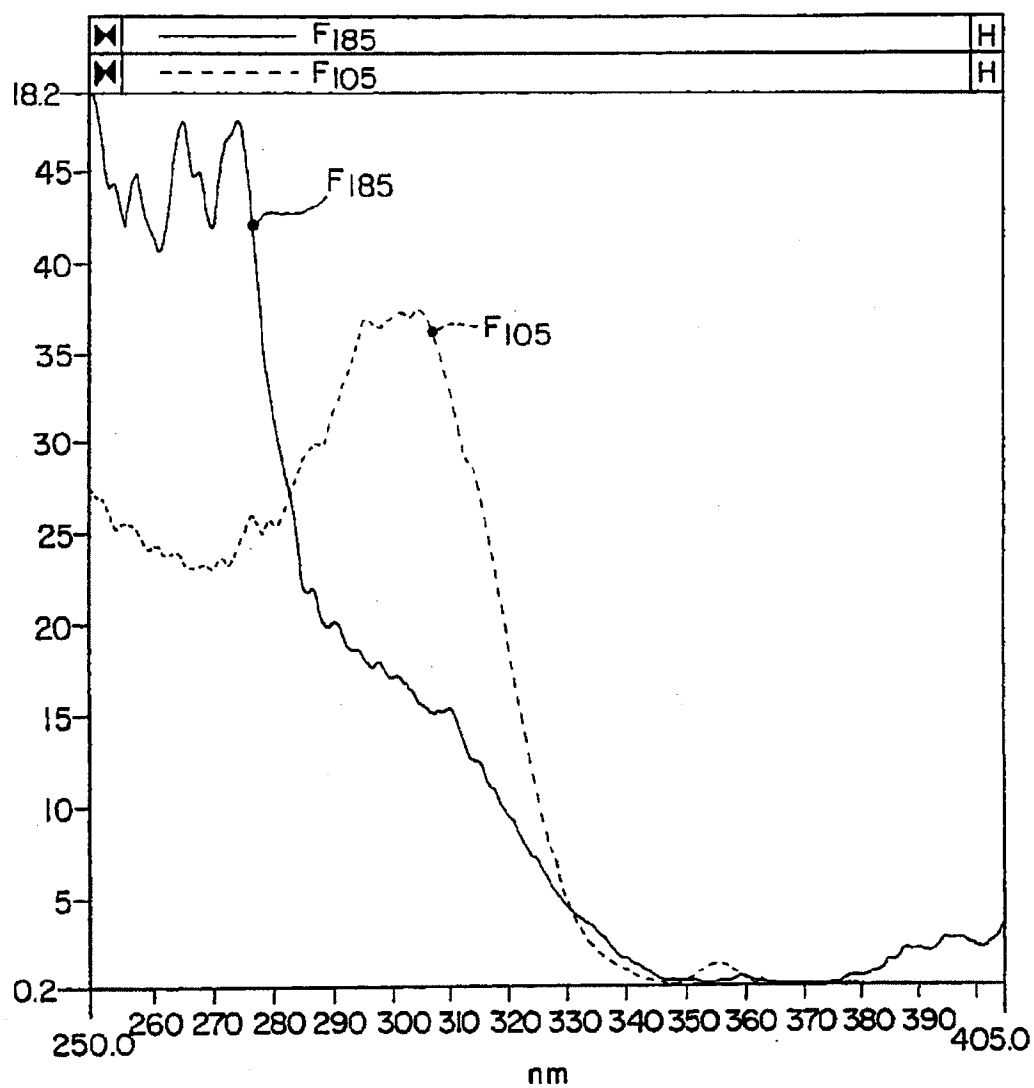


FIG. 24

【図25】

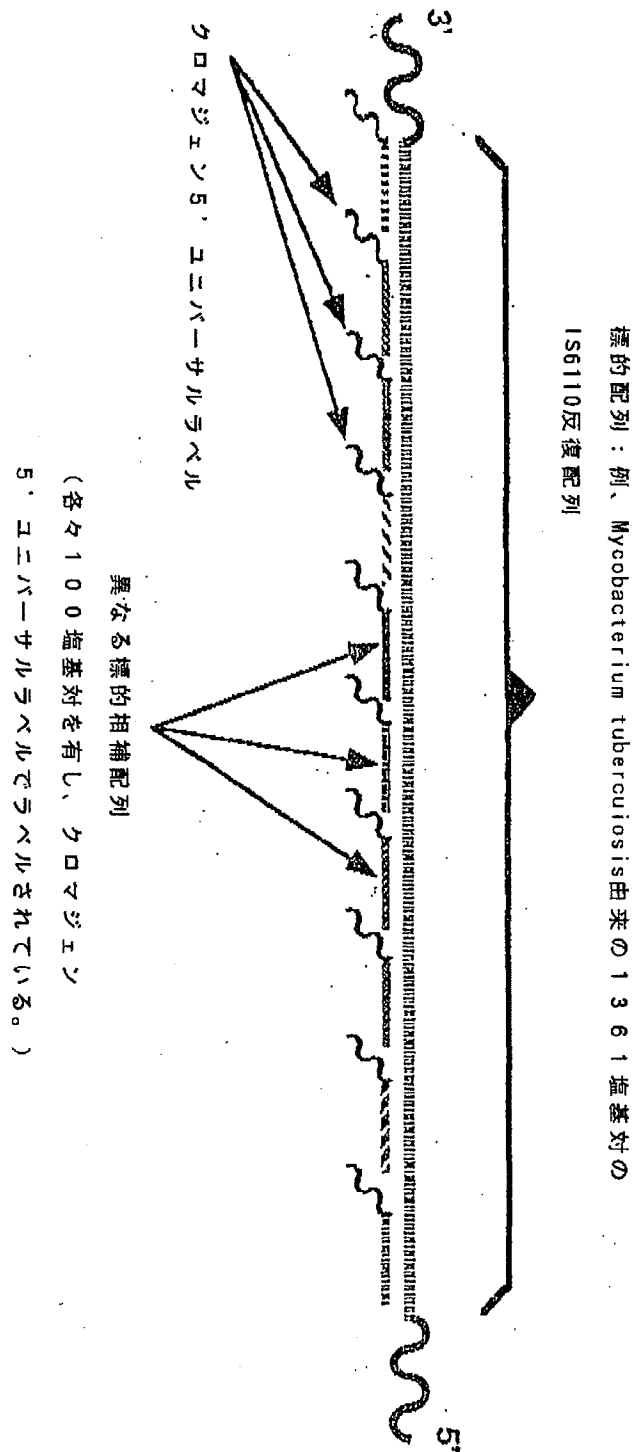


Figure 25

【図26】

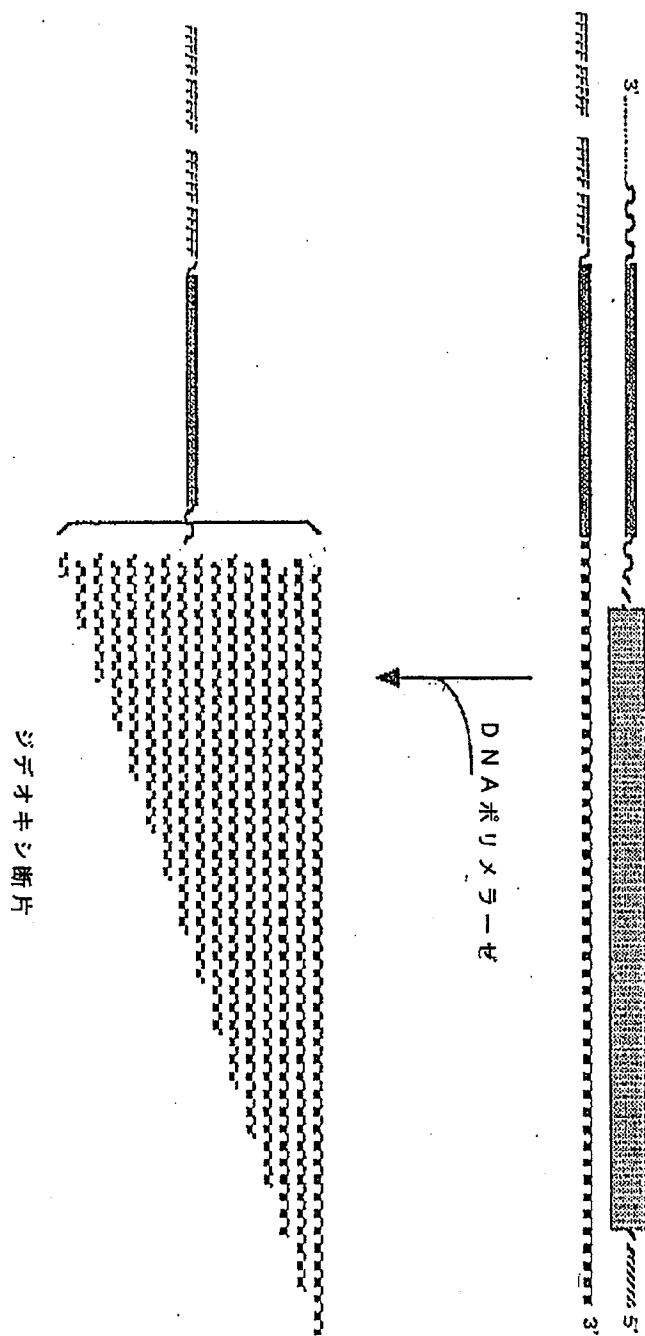


Figure 26

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US 94/09316

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07H21/00 C12Q1/68 C07H19/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07H C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,93 16094 (CHROMAGEN, INC.) 19 August 1993 see claims 1-32 see figures 1-21	1-14
A	EP,A,0 235 301 (TEIJIN LIMITED) 9 September 1987 see page 36, line 20 - page 39, line 34	1-14
A	US,A,3 960 840 (UNIVERSITY OF ILLINOIS FOUNDATION) 1 June 1976 see the whole document	1
A	PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 12, no. 239 (C-491) 27 April 1988 & JP,A,62 255 499 (TEIJIN LTD.) 7 November 1987 see abstract	1
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 23 November 1994		Date of mailing of the international search report 21. 12 94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Scott, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter- national Application No. PCT/US 94/09316

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>PATENT ABSTRACTS OF JAPAN vol. 11, no. 259 (C-441) 21 August 1987 & JP,A,62 059 293 (TEIJIN LTD.) 14 March 1987 see abstract</p> <p>-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 94/09316

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9316094	19-08-93	CA-A- 2129105	19-08-93
EP-A-0235301	09-09-87	DE-A- 3686150	27-08-92
		WO-A- 8701373	12-03-87
		US-A- 4965350	23-10-90
US-A-3960840	01-06-76	NONE	